



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : A61K 39/295 // C12N 15/38, 14/44, 15/31		A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 98/03198
			(43) Date de publication internationale: 29 janvier 1998 (29.01.98)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR97/01314 (22) Date de dépôt international: 15 juillet 1997 (15.07.97) (30) Données relatives à la priorité: 96/09400 19 juillet 1996 (19.07.96) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): MERIAL [FR/FR]; 17, rue Bourgelat, F-69002 Lyon (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): AUDONNET, Jean-Christophe [FR/FR]; 119, rue de Créqui, F-69006 Lyon (FR). BOUCHARDON, Annabelle [FR/FR]; 118, cours Gambetta, F-69007 Lyon (FR). RIVIERE, Michel [FR/FR]; 11, chemin du Chancelier, F-69130 Ecully (FR). (74) Mandataire: COLOMBET, Alain; Cabinet Lavoix, 2, place d'Estienne d'Orves, F-75441 Paris Cedex 09 (FR).		(81) Etats désignés: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, brevet ARIPO (GH, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Publiée Avec rapport de recherche internationale. Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.	
(54) Title: POLYNUCLEOTIDE VACCINE FORMULA FOR TREATING HORSE DISEASES (54) Titre: FORMULE DE VACCIN POLYNUCLEOTIDIQUE CONTRE LES PATHOLOGIES DU CHEVAL (57) Abstract <p>A vaccine formula for treating equine and particularly horse diseases, including at least three polynucleotide vaccine valencies that each include a plasmid containing an equine pathogen valency gene capable of being expressed <i>in vivo</i> in host cells. Said valencies are selected from the group which consists of equine rhinopneumonitis virus EHV, equine influenza virus EIV and tetanus antitoxin. Said plasmids include one or more genes per valency, and said genes are selected from the group which consists of gB and gD for equine rhinopneumonitis virus, HA, NP and N for equine influenza virus, and a gene coding for all or part of subunit C of <i>Cl. tetani</i>.</p> (57) Abrégé <p>La formule de vaccin contre des pathologies des équidés et notamment des chevaux, comprenant au moins 3 valences de vaccin polynucléotidique comprenant chacune un plasmide intégrant, de manière à l'exprimer <i>in vivo</i> dans les cellules hôtes, un gène d'une valence de pathogène équin, ces valences étant choisies parmi celles du groupe consistant en virus de la rhinopneumonie équine EHV, virus de la grippe équine EIV et anatoxine de la toxine tétanique, ces plasmides comprenant, pour chaque valence, un ou plusieurs des gènes choisis parmi le groupe consistant en gB et gD pour le virus de la rhinopneumonie équine, HA, NP, N pour le virus de la grippe équine et un gène codant pour tout ou partie de la sous-unité C de <i>Cl. tetani</i>.</p>			

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Stovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brsil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakhstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

FORMULE DE VACCIN POLYNUCLEOTIDIQUE CONTRE LES PATHOLOGIES DU CHEVAL

5 La présente invention est relative à une formule de vaccin permettant la vaccination des équidés, notamment des chevaux. Elle est également relative à une méthode de vaccination correspondante.

10 La pathologie des chevaux présente une assez grande diversité. Outre les pathologies respiratoires bien connues, telles que la rhinopneumonie et la grippe, les chevaux sont sensibles, notamment sur le continent américain, aux diverses encéphalites. Enfin, les chevaux présentent diverses autres pathologies parmi lesquelles on peut citer, notamment, le

15 le tétanos, la maladie de Lyme, l'artérite équine, sans oublier les risques d'exposition au virus de la rage.

Les conditions d'exposition des chevaux aux divers microorganismes pathogènes ont été multipliées par les déplacements de nombreux chevaux sur les distances importantes par voie de terre ou par voie aérienne, de sorte que le risque

20 infectieux a tendance à augmenter.

Or, compte-tenu du coût élevé de ces animaux, notamment dans le cas des reproducteurs, des chevaux de selle et des chevaux de course, il est économiquement important de contrôler le plus possible les risques infectieux se traduisant par de

25 longues indisponibilités de l'animal, voir sa perte. Il existe déjà un certain nombre de vaccins pour chevaux, dont l'efficacité est variable.

Ainsi, ont été développés, pour la rhinopneumonie équine, provoquée par les différentes souches d'herpès virus équin (EHV), des vaccins inactivés ou de sous-unités, qui présentent

30 cependant tous un certain nombre de limites se traduisant par des protections incomplètes et de courte durée et éventuellement des problèmes d'innocuité liés aux adjuvants utilisés.

35 La grippe équine constitue également une pathologie importante, que l'on cherche, également à prévenir par la vaccination. Les vaccins utilisés sont des vaccins inactivés ou de sous-unités, qui présentent une certaine efficacité mais qui

ne restent pas néanmoins sans problème. En effet, il est fréquent que la protection ne soit pas complète et elle est généralement d'une durée relativement brève, nécessitant, comme pour la rhinopneumonie, des revaccinations. On peut aussi
5 rencontrer des problèmes d'innocuité.

Des vaccins à base d'anatoxine antitétanique ont également été mis au point et présentent une efficacité indéniable.

Il existe également des vaccins contre les encéphalites, quelques encéphalites de l'Est, l'encéphalite de l'Ouest et
10 l'encéphalite vénézuélienne, dont l'efficacité est encore mal connue.

Pour des raisons tenant d'une part à l'économie, et d'autre part à la gestion rationnelle des vaccinations équine, on a déjà proposé des formulations de vaccin multivalent pour
15 la prévention de plusieurs de ces maladies infectieuses.

Les associations développées jusqu'à présent étaient réalisées à partir de vaccins inactivés ou de vaccins vivants et éventuellement de mélanges de tels vaccins. Leur mise en oeuvre pose des problèmes de compatibilité entre valences et de
20 stabilité. Il faut en effet assurer à la fois la compatibilité entre les différentes valences, que ce soit au plan des différents antigènes utilisés et au plan des formulations elles-mêmes, notamment dans le cas où l'on combine à la fois des vaccins inactivés et des vaccins vivants. Il se pose
25 également le problème de la conservation de tels vaccins combinés et aussi de leur innocuité notamment en présence d'adjuvant. Ces vaccins sont en général assez coûteux.

En outre, ces formulations n'ont pas permis d'associer trois des valences majeures, à savoir les valences grippe
30 équine, rhinopneumonie, notamment EHV-1 et EHV-4, et tétanos. On connaît, par exemple, les associations des valences grippes et encéphalites, ou rhinopneumie et encéphalites.

Les demandes de brevet WO-A-90 11 092, WO-A-93 19 183, WO-A-94 21 797 et WO-A-95 20 660 ont proposé de faire usage de la
35 technique récemment développée des vaccins polynucléotidiques. On sait que ces vaccins utilisent un plasmide apte à exprimer dans les cellules de l'hôte l'antigène inséré dans le plasmide. Toutes les voies d'administration ont été proposées

(intrapéritonéale, intraveineuse, intramusculaire, transcutanée, intradermique, mucoale, etc.). Différents moyens de vaccination peuvent également être utilisés, tels que ADN déposé à la surface de particules d'or et projeté de façon à pénétrer dans la peau de l'animal (Tang et al., Nature 356, 152-154, 1992) et les injecteurs par jet liquide permettant d'assurer la transfection à la fois dans la peau, le muscle, les tissus graisseux, et les tissus mammaires (Furth et al., Analytical Biochemistry, 205, 365-368, 1992).

Les vaccins polynucléotidiques peuvent utiliser aussi bien des ADN nus que des ADN formulés, par exemple au sein des liposomes ou de lipides cationiques.

Des vecteurs polynucléotidiques, intégrant les gènes HA ou NP, ont été essayés pour le virus de la grippe (influenza virus) chez la souris, le furet et le poulet. Aucune donnée n'est disponible chez le cheval.

Concernant le tétanos, il a été rapporté, récemment, que l'immunisation de souris par un plasmide exprimant, avec le fragment C, la région C-terminale non toxique de la toxine tétanique, induisait l'apparition d'anticorps séro-protecteurs chez la souris.

Il n'est cependant pas possible de transposer directement les enseignements des résultats obtenus chez ces animaux de faibles longévités à celui d'autres mammifères, et notamment les mammifères de grandes tailles.

La protection des équidés et notamment des chevaux contre la pathologie infectieuse demande donc toujours à être améliorée.

L'invention se propose de fournir une formule de vaccin multivalent permettant d'assurer une vaccination des équidés, et notamment des chevaux, contre un certain nombre d'agents pathogènes.

Un autre objectif de l'invention est de fournir une telle formule de vaccin associant différentes valences tout en présentant les critères requis de compatibilité et de stabilité des valences entre elles.

Un autre objectif de l'invention est de fournir une telle formule de vaccin permettant d'associer différentes valences

dans un même véhicule.

Un autre objectif de l'invention est de fournir une telle formule de vaccin qui soit de mise en oeuvre aisée et peu coûteuse.

5 Un autre objectif encore de l'invention est de fournir une telle formule et une méthode de vaccination des chevaux qui permette d'obtenir une protection, y compris une protection multivalente, avec un niveau élevé d'efficacité et de longue durée, et une bonne innocuité.

10 La présente invention a donc pour objet une formule de vaccin contre des pathologies des équidés et notamment des chevaux, comprenant au moins 3 valences de vaccin polynucléotidique comprenant chacune un plasmide intégrant, de
15 manière à l'exprimer in vivo dans les cellules, un gène d'une valence de pathogène équin, ces valences étant choisies parmi celles du groupe consistant en virus de la rhinopneumonie équine EHV, virus de la grippe équine EIV et le tétanos (Cl. tetani), ces plasmides comprenant, pour chaque valence, un ou
20 plusieurs des gènes choisis parmi le groupe consistant en gB et gD pour le virus de la rhinopneumonie équine, HA, NP, N pour le virus de la grippe équine et un gène codant pour tout ou partie de la sous-unité C de la toxine tétanique.

Par valence, dans la présente invention, on entend au moins un antigène assurant une protection contre le virus du
25 pathogène considéré, la valence pouvant contenir, à titre de sous-valence, un ou plusieurs gènes naturels ou modifiés d'une ou plusieurs souches du pathogène considéré.

Par gène d'agent pathogène, on entend non seulement le gène complet, mais aussi les séquences nucléotidiques
30 différentes, y compris fragments, conservant la capacité à induire une réponse protectrice. La notion de gène recouvre les séquences nucléotidiques équivalentes à celles décrites précisément dans les exemples, c'est-à-dire les séquences différentes mais codant pour la même protéine. Elle recouvre
35 aussi les séquences nucléotidiques d'autres souches du pathogène considéré, assurant une protection croisée ou une protection spécifique de souche ou de groupe de souche. Elle recouvre encore les séquences nucléotidiques qui ont été

modifiées pour faciliter l'expression in vivo par l'animal hôte mais codant pour la même protéine.

5 Ainsi, de manière particulièrement préférée, le vaccin selon l'invention comprend dans la valence rhinopneumonie équine, au moins un antigène de la souche EHV-1 et au moins un
antigène de la souche EHV-4, et de préférence le même type d'antigène.

10 Les quantités thérapeutiquement efficaces des valences polynucléotidiques sont contenues ou destinées à être contenues, dans un véhicule convenable pour une administration à l'animal, et de préférence pour une administration intramusculaire. De préférence, ce véhicule est un véhicule aqueux dépourvu de constituants huileux.

15 En ce qui concerne la valence rhinopneumonie équine, on préférera associer les gènes gB et gD, de préférence des souches EHV, notamment souches 1 et 4.

20 En ce qui concerne la valence grippe équine, on préfère utiliser le gène codant pour l'hémagglutinine HA ou l'association des gènes codant pour HA et NP. De préférence, on associera dans le même vaccin, les séquences HA de virus influenza, en particulier des différentes souches rencontrées sur le terrain. En revanche, NP assure une protection croisée et l'on pourra donc se contenter de la séquence d'une seule souche du virus.

25 Pour la valence tétanos, on préférera la sous-unité C éventuellement modifiée par mutation ou délétion.

30 L'association de gènes codant pour plusieurs antigènes d'une même valence, ou d'une même souche dans une valence, peut être réalisée par le mélange de plasmide exprimant un seul antigène, ou au contraire en insérant plusieurs gènes dans un même plasmide.

35 La combinaison des différentes valences du vaccin selon l'invention peut être effectuée, de préférence, par mélange de plasmides polynucléotidiques exprimant un ou des antigènes de chaque valence, mais on peut également prévoir de faire exprimer plusieurs antigènes de plusieurs valences par un même vecteur de type plasmidique.

Dans une forme perfectionnée de l'invention, la

formulation peut encore comporter une ou plusieurs autres valences d'autres pathogènes des équins, et notamment des valences des virus de l'encéphalite de l'Est EEV, de l'encéphalite de l'Ouest WEV et de l'encéphalite vénézuélienne VEV, de préférence les trois simultanément.

Parmi ces valences peuvent également figurer avantageusement la valence de la maladie de Lyme, B. burgdorferi, de l'artérite équine (EAV) et de la rage.

Parmi les gènes des encéphalites précitées, on utilise les gènes des antigènes C et E2, et de préférence le gène E2 seul ou l'association des deux gènes E2 et C.

Dans la valence de la maladie de Lyme, on choisit parmi les gènes OspA, OspB et p100, de préférence OspA.

Pour l'artérite équine, on retiendra les gènes E, M et N, seuls ou associés.

Pour la rage, on retiendra le gène G.

Une formule de vaccin selon l'invention pourra se présenter sous un volume de doses compris entre 0,1 et 10 ml et en particulier entre 1 et 5 ml.

La dose sera généralement comprise entre 10 ng et 1 mg, notamment entre 100 ng et 500 µg, et préférentiellement entre 1 µg et 250 µg par type de plasmide.

On utilisera de préférence des plasmides nus, simplement placés dans le véhicule de vaccination qui sera en général de l'eau physiologique (NaCl 0,9 %), de l'eau ultrapure, du tampon TE, etc. On peut bien entendu utiliser toutes les formes de vaccin polynucléotidique décrites dans l'art antérieur.

Chaque plasmide comprend un promoteur apte à assurer l'expression du gène inséré sous sa dépendance dans les cellules hôtes. Il s'agira, en général, d'un promoteur eucaryote fort, et en particulier d'un promoteur précoce du cytomégalovirus CMV-IE, d'origine humaine ou murine, ou encore éventuellement d'une autre origine telle que rat, porc, cobaye.

De manière plus générale, le promoteur pourra être soit d'origine virale, soit d'origine cellulaire. Comme protecteur viral autre que CMV-IE, on peut citer le promoteur précoce ou tardif du virus SV 40 ou le promoteur LTR du virus du Sarcome de Rous. Il peut aussi s'agir d'un promoteur du virus dont

provient le gène, par exemple le promoteur propre au gène.

Comme promoteur cellulaire, on peut citer le promoteur d'un gène du cytosquelette, tel que par exemple le promoteur de la desmine (Polmont et al., Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology, 1990, 22, 117-122 ; et Zhenlin et al., Gene, 1989, 78, 243-254), ou encore le promoteur de l'actine.

Lorsque plusieurs gènes sont présent dans un même plasmide, ceux-ci peuvent être présentés dans la même unité de transcription ou dans deux unités différentes.

L'invention a encore pour objet des formules de vaccin monovalent comprenant un ou plusieurs plasmides codant pour un ou plusieurs gènes de l'un des agents pathogènes précités, et notamment de la rhinopneumonie ou de la maladie de Lyme, de l'artérite équine, de l'encéphalite de l'Est, de l'encéphalite de l'Ouest et de l'encéphalite vénézuélienne, les gènes étant ceux décrits plus haut. Ces formules peuvent comprendre les caractéristiques énoncées plus haut en ce qui concerne le choix des gènes d'un même pathogène et leur combinaison, la composition des plasmides, les volumes de doses, les dosages, etc.

La présente invention a également pour objet une méthode de vaccination des équidés et notamment des chevaux contre des maladies infectieuses, comprenant l'administration d'une dose efficace d'une formule de vaccin, multivalente ou monovalente, telle que décrite plus haut.

Cette méthode de vaccination comprend l'administration d'une ou de plusieurs doses de la formule de vaccin.

Les formules de vaccin selon l'invention pourront être administrées par les différents voies d'administration proposées dans le cadre général de la vaccination polynucléotidique et au moyen des techniques d'administration connues. On préférera cependant nettement la voie intramusculaire.

On peut aussi vacciner par voie intradermique à l'aide d'un injecteur par jet liquide, de préférence par jets multiples, et en particulier un injecteur utilisant une tête d'injection munie de plusieurs trous ou buses, notamment comprenant de 5 à 6 trous ou buses, tel que l'appareil Pigjet

fabriqué et distribué par la société Endoscoptic, Laons, France.

Le volume de dose pour un tel appareil sera réduit de préférence entre 0,1 et 0,9 ml, en particulier entre 0,2 et 0,6 ml et avantageusement entre 0,4 et 0,5 ml, le volume pouvant être administré en une ou plusieurs, de préférence 2, applications.

Les vaccins monovalents précités peuvent être notamment utilisés pour la préparation du vaccin polyvalent selon l'invention.

Les formules de vaccin monovalent peuvent aussi être utilisées associées à un vaccin d'un autre type (entier vivant ou inactivé, recombinant, sous-unité) contre une autre pathologie ou comme rappel d'un vaccin comme décrit ci-après.

La présente invention a en effet encore pour objet l'utilisation d'un ou de plusieurs plasmides selon l'invention pour la fabrication d'un vaccin destiné à vacciner des chevaux primo-vaccinés au moyen d'un premier vaccin classique (monovalent ou multi-valent) du type de ceux de l'art antérieur, choisi notamment dans le groupe consistant en vaccin entier vivant, vaccin entier inactivé, vaccin de sous-unité, vaccin recombinant, ce premier vaccin présentant (c'est-à-dire contenant ou pouvant exprimer) le ou les antigène(s) codé(s) par le ou les plasmide(s) ou antigène(s) assurant une protection croisée.

De manière remarquable, le vaccin polynucléotidique a un effet de rappel puissant se traduisant par une amplification de la réponse immunitaire et l'instauration d'une immunité de longue durée.

De manière générale, les vaccins de primo-vaccination pourront être choisis parmi les vaccins commerciaux disponibles auprès des différents producteurs de vaccins vétérinaires.

Dans une forme de mise en oeuvre préférée du procédé selon l'invention, on administre dans un premier temps, à l'animal, une dose efficace du vaccin de type classique, notamment inactivé, vivant, atténué ou recombinant, ou encore un vaccin de sous-unité de façon à assurer une primo-vaccination, et, après un délai de préférence de 2 à 4 semaines, on assure

l'administration du vaccin polyvalent ou monovalent selon l'invention.

5 L'invention a aussi pour objet un kit de vaccination regroupant une formule de vaccin selon l'invention et un vaccin de primo-vaccination tel que décrit ci-dessus. Elle a aussi trait à une formule de vaccin selon l'invention accompagnée d'une notice indiquant l'usage de cette formule comme rappel d'une primo-vaccination telle que décrite ci-avant.

10 L'invention concerne aussi la méthode de préparation des formules de vaccin, à savoir la préparation des valences et leurs mélanges, telle qu'elle ressort de cette description.

L'invention va être maintenant décrite plus en détail à l'aide de modes de réalisation de l'invention pris en référence aux dessins.

15

20

25

30

35

Liste des figures

- Figure N° 1 : Plasmide pVR1012
- Figure N° 2 : Plasmide pAB042
- 5 Figure N° 3 : Plasmide pAB031
- Figure N° 4 : Plasmide pAB013
- Figure N° 5 : Plasmide pAB032
- Figure N° 6 : Plasmide pAB043
- Figure N° 7 : Plasmide pAB033
- 10 Figure N° 8 : Séquence du gène HA Grippe équine souche Fontainebleau
- Figure N° 9 : Plasmide pAB099
- Figure N° 10 : Plasmide pAB085
- Figure N° 11 : Plasmide pAB084
- Figure N° 12 : Plasmide pAB070
- 15 Figure N° 13 : Plasmide pAB017
- Figure N° 14 : Plasmide pAB094
- Figure N° 15 : Plasmide pAB093
- Figure N° 16 : Plasmide pAB096
- Figure N° 17 : Plasmide pAB095
- 20 Figure N° 18 : Plasmide pAB098
- Figure N° 19 : Plasmide pAB097
- Figure N° 20 : Plasmide pAB041

Liste des séquences SEQ ID N°

- 25
- SEQ ID N° 1 : Oligonucléotide AB013
- SEQ ID N° 2 : Oligonucléotide AB014
- SEQ ID N° 3 : Oligonucléotide AB071
- SEQ ID N° 4 : Oligonucléotide AB074
- 30 SEQ ID N° 5 : Oligonucléotide AB030
- SEQ ID N° 6 : Oligonucléotide AB031
- SEQ ID N° 7 : Oligonucléotide AB075

- SEQ ID N° 8 : Oligonucléotide AB076
- SEQ ID N° 9 : Oligonucléotide AB015
- SEQ ID N° 10 : Oligonucléotide AB016
- SEQ ID N° 11 : Oligonucléotide AB077
- 5 SEQ ID N° 12 : Oligonucléotide AB078
- SEQ ID N° 13 : Oligonucléotide AB186
- SEQ ID N° 14 : Oligonucléotide AB187
- SEQ ID N° 15 : Séquence du gène HA Grippe équine (souche Fontainebleau)
- SEQ ID N° 16 : Oligonucléotide AB156
- 10 SEQ ID N° 17 : Oligonucléotide AB159
- SEQ ID N° 18 : Oligonucléotide AB157
- SEQ ID N° 19 : Oligonucléotide AB128
- SEQ ID N° 20 : Oligonucléotide AB129
- SEQ ID N° 21 : Oligonucléotide AB038
- 15 SEQ ID N° 22 : Oligonucléotide AB039
- SEQ ID N° 23 : Oligonucléotide AB176
- SEQ ID N° 24 : Oligonucléotide AB177
- SEQ ID N° 25 : Oligonucléotide AB174
- SEQ ID N° 26 : Oligonucléotide AB175
- 20 SEQ ID N° 27 : Oligonucléotide AB180
- SEQ ID N° 28 : Oligonucléotide AB181
- SEQ ID N° 29 : Oligonucléotide AB178
- SEQ ID N° 30 : Oligonucléotide AB179
- SEQ ID N° 31 : Oligonucléotide AB184
- 25 SEQ ID N° 32 : Oligonucléotide AB185
- SEQ ID N° 33 : Oligonucléotide AB182
- SEQ ID N° 34 : Oligonucléotide AB183
- SEQ ID N° 35 : Oligonucléotide AB011
- SEQ ID N° 36 : Oligonucléotide AB012

EXEMPLES

Exemple 1 : Culture des virus

Les virus sont cultivés sur le système cellulaire approprié jusqu'à obtention d'un
5 effet cytopathique. Les systèmes cellulaires à utiliser pour chaque virus sont
bien connus de l'homme du métier. Brièvement, des cellules sensibles au virus
utilisé, cultivées en milieu minimum essentiel de Eagle (milieu "MEM) ou un
autre milieu approprié, sont inoculées avec la souche virale étudiée en utilisant
10 une multiplicité d'infection de 1. Les cellules infectées sont alors incubées à
37°C pendant le temps nécessaire à l'apparition d'un effet cytopathique
complet (en moyenne 36 heures).

Exemple 2 : Culture des bactéries:

Tétanos.....Les bactéries sont cultivées dans les milieux appropriés et selon
15 les conditions bien connues de l'homme de l'art de manière à obtenir une
biomasse bactérienne suffisante pour l'extraction du matériel génétique. Cette
extraction se fait selon les techniques usuelles décrites par Sambrook J. *et al.*
(*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd Edition. Cold Spring Harbor
Laboratory. Cold Spring Harbor. New York. 1989).
20 Les souches de *Borrelia burgdorferi* sont cultivées dans les milieux appropriés
et selon les conditions bien connues de l'homme de l'art. Ces conditions et
milieux sont en particulier décrits par A. Barbour (J. Biol. Med. 1984. 57. 71-
75). L'extraction de l'ADN bactérien a été réalisé selon les conditions décrites
par W. Simpson et al. (Infect. Immun. 1990. 58. 847-853). Les techniques
25 usuelles décrites par J. Sambrook *et al.* (*Molecular Cloning: A Laboratory
Manual*. 2nd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor. New
York. 1989) peuvent également être utilisées.

Exemple 3 : Extraction des ADNs génomiques viraux:

30 Après culture, le surnageant et les cellules lysées sont récoltées et la totalité de
la suspension virale est centrifugée à 1000 g pendant 10 minutes à + 4°C
pour éliminer les débris cellulaires. Les particules virales sont alors récoltées par

ultracentrifugation à 400000 g pendant 1 heure à + 4°C. Le culot est repris dans un volume minimum de tampon (Tris 10 mM, EDTA 1 mM). Cette suspension virale concentrée est traitée par la protéinase K (100 µg/ml final) en présence de sodium dodecyl sulfate (SDS) (0,5% final) pendant 2 heures à 37°C. L'ADN viral est ensuite extrait avec un mélange de phénol/chloroforme, puis précipité avec 2 volumes d'éthanol absolu. Après une nuit à - 20°C, l'ADN est centrifugé à 10000 g pendant 15 minutes à + 4°C. Le culot d'ADN est séché, puis repris dans un volume minimum d'eau ultrapure stérile. Il peut alors être digéré par des enzymes de restriction.

10

Exemple 4 : Isolement des ARNs génomiques viraux

Les virus à ARN ont été purifiés selon les techniques bien connues de l'homme du métier. L'ARN viral génomique de chaque virus a été ensuite isolé en utilisant la technique d'extraction "thiocyanate de guanidium/phénol-chloroforme" décrite par P. Chomczynski et N. Sacchi (Anal. Biochem. 1987, 162, 156-159).

Exemple 5 : Techniques de biologie moléculaire

Toutes les constructions de plasmides ont été réalisées en utilisant les techniques standards de biologie moléculaire décrites par J. Sambrook *et al.* (*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1989). Tous les fragments de restriction utilisés pour la présente invention ont été isolés en utilisant le kit "Geneclean" (BIO101 Inc. La Jolla, CA).

25

Exemple 6 : Technique de RT-PCR

Des oligonucléotides spécifiques (comportant à leurs extrémités 5' des sites de restriction pour faciliter le clonage des fragments amplifiés) ont été synthétisés de telle façon qu'ils couvrent entièrement les régions codantes des gènes devant être amplifiés (voir exemples spécifiques). La réaction de transcription inverse (RT) et l'amplification en chaîne par polymérase (PCR) ont été effectuées selon les techniques standards (Sambrook J. *et al.* 1989). Chaque

30

réaction de RT-PCR a été faite avec un couple d'amplimers spécifiques et en prenant comme matrice l'ARN génomique viral extrait. L'ADN complémentaire amplifié a été extrait au phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25:24:1) avant d'être digéré par les enzymes de restriction.

5

Exemple 7 : plasmide pVR1012

Le plasmide pVR1012 (Figure N° 1) a été obtenu auprès de Vical Inc. San Diego, CA, USA. Sa construction a été décrite dans J. Hartikka *et al.* (Human Gene Therapy. 1996. 7. 1205-1217).

10

Exemple 8 : Construction du plasmide pAB042 (gène EHV-1 gB)

Une réaction de PCR a été réalisée avec l'ADN génomique de l'herpèsvirus équin de type 1 (EHV-1) (Souche Kentucky D) (P. Guo *et al.* J. Virol. 1990. 64. 2399-2406) et avec les oligonucléotides suivants:

15 AB013 (32 mer) (SEQ ID N° 1)

5'AAAAC~~T~~GCAGCCGTCATGTCCTCTGGTTGCCG 3'

AB014 (39 mer) (SEQ ID N° 2)

5'ATAAGAAGCGGCCGCTAAACATGTTTAAACCATTTTTTC 3'

pour isoler le gène codant pour la glycoprotéine gB (EHV-1 gB) sous la forme d'un fragment PstI-NotI. Après purification, le produit de PCR de 2981 pb a été digéré par *PstI* et *NotI* pour isoler un fragment PstI-NotI de 2959 pb. Ce fragment a été ligaturé avec le vecteur pVR1012 (exemple 7), préalablement digéré avec *PstI* et *NotI*, pour donner le plasmide pAB042 (7841 pb) (Figure N° 2).

25

Exemple 9 : Construction du plasmide pAB031 (gène EHV-4 gB)

Une réaction de PCR a été réalisée avec l'ADN génomique de l'herpèsvirus équin de type 4 (EHV-4) (Souche 1942) (M. Riggio *et al.* J. Virol. 1989. 63. 1123-1133) et avec les oligonucléotides suivants:

30 AB071 (38 mer) (SEQ ID N° 3)

5'AAAAC~~T~~GCAGACATGTCCACTTGTTGCCGTGCTATTTG 3'

AB074 (36 mer) (SEQ ID N° 4)

5'CTAGTCTAGATTAAACCATTTTTTCGCTTTCCATGG 3'

pour amplifier un fragment de 2949 pb contenant le gène codant pour la glycoprotéine gB du EHV-4 sous la forme d'un fragment *Pst*I-XbaI. Après purification, le produit de PCR a été digéré par *Pst*I et *Xba*I pour donner un

5 fragment *Pst*I-XbaI de 2931 pb.

Ce fragment a été ligaturé avec le vecteur pVR1012 (exemple 7), préalablement digéré avec *Pst*I et *Xba*I, pour donner le plasmide pAB031 (7806 pb) (Figure N° 3).

10 Exemple 10 : Construction du plasmide pAB013 (gène EHV-1 gD)

Une réaction de PCR a été réalisée avec l'ADN génomique de l'herpèsvirus équin de type 1 (EHV-1) (Souche Kentucky D) (J.C. Audonnet *et al.* J. Gen. Virol. 1990. 71. 2969-2978) et avec les oligonucléotides suivants:

AB030 (32 mer) (SEQ ID N° 5)

15 5'AAAACTGCAGCATGTCTACCTTCAAGCTTATG 3'

AB031 (37 mer) (SEQ ID N° 6)

5'CGCGGATCCTTACGGAAGCTGGGTATATTTAACATCC 3'

pour isoler le gène codant pour la glycoprotéine gD (EHV-1 gD) sous la forme d'un fragment *Pst*I-BamHI. Après purification, le produit de PCR de 1228 pb a

20 été digéré par *Pst*I et *Bam*HI pour isoler un fragment *Pst*I-BamHI de 1211 pb. Ce fragment a été ligaturé avec le vecteur pVR1012 (exemple 7), préalablement digéré avec *Pst*I et *Bam*HI, pour donner le plasmide pAB013 (6070 pb) (Figure N° 4).

25 Exemple 11 : Construction du plasmide pAB032 (gène EHV-4 gD)

Une réaction de PCR a été réalisée avec l'ADN génomique de l'herpèsvirus équin de type 4 (EHV-4) (A. Cullinane *et al.* J. Gen. Virol. 1993. 74. 1959-1964) et avec les oligonucléotides suivants:

AB075 (33 mer) (SEQ ID N° 7)

30 5'AAAACTGCAGATATGTCTACCTTCAAGCCTATG 3'

AB076 (33 mer) (SEQ ID N° 8)

5'CGCGGATCCTTACGGAAGCTGAGTATATTTGAC 3'

pour isoler le gène codant pour la glycoprotéine gD du EHV-4 (EHV-4 gD) sous la forme d'un fragment *Pst*I-*Bam*HI. Après purification le produit de PCR de 1230 pb a été digéré par *Pst*I et *Bam*HI pour isoler un fragment *Pst*I-*Bam*HI de 1212 pb. Ce fragment a été ligaturé avec le vecteur pVR1012 (exemple 7),
5 préalablement digéré avec *Pst*I et *Bam*HI, pour donner le plasmide pAB032 (6071 pb) (Figure N° 5).

Exemple 12 : Construction du plasmide pAB043 (gène grippe équine HA souche Prague)

10 Une réaction de RT-PCR selon la technique décrite dans l'exemple 6 a été réalisée avec l'ARN génomique du virus de la grippe équine (Equine Influenza Virus ou EIV) (Souche H7N7 Prague) (J. Mc Cauley. N° d'accès séquence sur Genbank = X62552), préparé selon la technique décrite dans l'exemple 4, et avec les oligonucléotides suivants:

15 AB015 (36 mer) (SEQ ID N° 9)

5'ACGCGTCGACATGAACACTCAAATTCTAATATTAGC 3'

AB016 (35 mer) (SEQ ID N° 10)

5'CGCGGATCCCTTATATACAAATAGTGCACCGCATG 3'

pour isoler le gène codant pour la glycoprotéine HA du virus de la grippe équine
20 sous la forme d'un fragment *Sal*I-*Bam*HI. Après purification, le produit de RT-PCR de 1733 pb a été digéré par *Sal*I et *Bam*HI pour isoler un fragment *Sal*I-*Bam*HI de 1720 pb. Ce fragment a été ligaturé avec le vecteur pVR1012 (exemple 7), préalablement digéré avec *Sal*I et *Bam*HI, pour donner le plasmide pAB043 (6588 pb) (Figure N° 6).

25

Exemple 13 : Construction du plasmide pAB033 (gène Grippe équine HA souche Suffolk)

Une réaction de RT-PCR selon la technique de l'exemple 6 a été réalisée avec l'ARN génomique du virus de la grippe équine (EIV) (Souche Suffolk) (M. Binns.

30 N° d'accès séquence sur Genbank = X68437), préparé selon la technique de l'exemple 4, et avec les oligonucléotides suivants:

AB077 (33 mer) (SEQ ID N° 11)

5'ACGCGTCGACGCATGAAGACAACCATTATTTTG 3'

AB078 (34 mer) (SEQ ID N° 12)

5'CGCGGATCCTCAAATGCAAATGTTGCATCTGATG 3'

pour isoler le gène codant pour la glycoprotéine HA du virus de la grippe équine

- 5 sous la forme d'un fragment *Sall*-*Bam*HI. Après purification, le produit de RT-PCR de 1729 pb a été digéré par *Sall* et *Bam*HI pour isoler un fragment *Sall*-*Bam*HI de 1717 pb. Ce fragment a été ligaturé avec le vecteur pVR1012 (exemple 7), préalablement digéré avec *Sall* et *Bam*HI, pour donner le plasmide pAB033 (6584 pb) (Figure N° 7).

10

Exemple 14 : Construction du plasmide pAB099 (gène Grippe équine HA souche Fontainebleau)

Une réaction de RT-PCR selon l'exemple 6 a été réalisée avec l'ARN génomique du virus de la grippe équine (EIV) (Souche Fontainebleau), préparé selon

- 15 l'exemple 4, et avec les oligonucléotides suivants:

AB186 (32 mer) (SEQ ID N° 13)

5'TTTGCGGCCGCATGAAGACAACCATTATTTTG 3'

AB187 (35 mer) (SEQ ID N° 14)

5'TTTGCGGCCGCTTACTCAAATGCAAATGTTGCATC 3'

- 20 pour isoler le gène codant pour la glycoprotéine HA du virus de la grippe équine (souche Fontainebleau) (Figure N° 8 et SEQ ID N° 15) sous la forme d'un fragment *Not*I-*Not*I. Après purification le produit de RT-PCR de 1724 pb a été digéré par *Not*I pour isoler un fragment *Not*I-*Not*I de 1710 pb. Ce fragment a été ligaturé avec le vecteur pVR1012 (exemple 7), préalablement digéré avec
- 25 *Not*I, pour donner le plasmide pAB099 (6625 pb) qui contient le gène HA (grippe équine souche Fontainebleau) dans la bonne orientation par rapport au promoteur (Figure N° 9).

- Exemple 15 : Construction du plasmide pAB085 (gène Grippe équine NP souche Prague)**
- 30

Une réaction de RT-PCR selon la technique de l'exemple 6 a été réalisée avec l'ARN génomique du virus de la grippe équine (EIV) (Souche H7N7 Prague) (O.

Gorman *et al.* J. Virol. 1991. 65. 3704-3714), préparé selon la technique de l'exemple 4, et avec les oligonucléotides suivants:

AB156 (32 mer) (SEQ ID N° 16)

5'CCGGTCGACATGGCGTCTCAAGGCACCAAACG 3'

5 AB159 (34 mer) (SEQ ID N° 17)

5'CGCGGATCCTTAATTGTCAAACCTTCTGCATTG 3'

pour isoler le gène codant pour la nucléoprotéine NP du virus de la grippe équine sous la forme d'un fragment Sall-BamHI. Après purification, le produit de RT-PCR de 1515 pb a été digéré par *Sall* et *Bam*HI pour isoler un fragment

10 Sall-BamHI de 1503 pb. Ce fragment a été ligaturé avec le vecteur pVR1012 (exemple 7), préalablement digéré avec *Sall* et *Bam*HI, pour donner le plasmide pAB085 (6371 pb) (Figure N° 10).

Exemple 16 : Construction du plasmide pAB084 (gène Grippe équine NP souche

15 Jillin)

Une réaction de RT-PCR selon la technique de l'exemple 6 a été réalisée avec l'ARN génomique du virus de la grippe équine (EIV) (Souche H3N8 Jillin) (O. Gorman *et al.* J. Virol. 1991. 65. 3704-3714), préparé selon la technique de l'exemple 4, et avec les oligonucléotides suivants:

20 AB156 (32 mer) (SEQ ID N° 16)

5'CCGGTCGACATGGCGTCTCAAGGCACCAAACG 3'

AB157 (34 mer) (SEQ ID N° 18)

5'CGCGGATCCTTAATTGTCATATTCCTCTGCATTG 3'

pour isoler le gène codant pour la nucléoprotéine NP du virus de la grippe

25 équine sous la forme d'un fragment Sall-BamHI. Après purification, le produit de RT-PCR de 1515 pb a été digéré par *Sall* et *Bam*HI pour isoler un fragment Sall-BamHI de 1503 pb. Ce fragment a été ligaturé avec le vecteur pVR1012 (exemple 7), préalablement digéré avec *Sall* et *Bam*HI, pour donner le plasmide pAB084 (6371 pb) (Figure N° 11).

Exemple 17 : Construction du plasmide pAB070 (gène sous-unité C toxine tétanique)

Une réaction de PCR a été réalisée avec l'ADN génomique de *Clostridium tetani* (Souche CN3911) (N. Fairweather *et al.* J. Bact. 1986. 165. 21-27), préparé

5 selon la technique de l'exemple 2, et avec les oligonucléotides suivants:

AB128 (34 mer) (SEQ ID N° 19)

5'AAACTGCAGATGAAAAATCTGGATTGTTGGGTTG 3'

AB129 (30 mer) (SEQ ID N° 20)

5'TTTGGATCCTTAATCATTTGTCCATCCTTC 3'

10 pour isoler la séquence codant pour la sous-unité C de la toxine de *Clostridium tetani* sous la forme d'un fragment PstI-BamHI. Après purification, le produit de PCR de 1377 pb a été digéré par PstI et BamHI pour isoler un fragment PstI-BamHI de 1361 pb. Ce fragment a été ligaturé avec le vecteur pVR1012 (exemple 7), préalablement digéré avec PstI et BamHI, pour donner le plasmide
15 pAB070 (6219 pb) (Figure N° 12).

Exemple 18 : Construction du plasmide pAB017 (gène ospA de *Borrelia burgdorferi*)

Une réaction de PCR a été réalisée avec l'ADN génomique de *Borrelia burgdorferi* (Souche B31) (S. Bergstrom *et al.* Mol. Microbiol. 1989. 3. 479-486), préparé selon la technique de l'exemple 2, et avec les oligonucléotides suivants:

AB038 (37 mer) (SEQ ID N° 21)

5'ACGCGTCGACTATGAAAAAATATTTATTGGGAATAGG 3'

25 AB039 (34 mer) (SEQ ID N° 22)

5'CGCGGATCCCTTATTTTAAAGCGTTTTTAATTTC 3'

pour isoler le gène codant pour la protéine de membrane OspA sous la forme d'un fragment Sall-BamHI. Après purification, le produit de PCR de 842 pb a été digéré par Sall et BamHI pour isoler un fragment Sall-BamHI de 829 pb. Ce
30 fragment a été ligaturé avec le vecteur pVR1012 (exemple 7), préalablement digéré avec Sall et BamHI, pour donner le plasmide pAB017 (5698 pb) (Figure N° 13).

Exemple 19 : Construction du plasmide pAB094 (gène E2 du virus de l'encéphalite de l'Est)

Une réaction de RT-PCR selon la technique de l'exemple 6 a été réalisée avec l'ARN génomique du virus de l'encéphalite de l'Est (EEV) (Souche North America 82V2137) (S. Weaver *et al.* Virology. 1993. 197. 375-390), préparé selon la technique de l'exemple 4, et avec les oligonucléotides suivants:

AB176 (34 mer) (SEQ ID N° 23)

5'AAACTGCAGATGGATTTGGACACTCATTTACCCC 3'

AB177 (44 mer) (SEQ ID N° 24)

10 5'CGCGGATCCTCAATAAAAATCATGCCCTCGTCGGCTTAATGCAG 3'

pour isoler le gène codant pour la glycoprotéine E2 du EEV sous la forme d'un fragment PstI-BamHI. Après purification, le produit de RT-PCR de 1294 pb a été digéré par *PstI* et *BamHI* pour isoler un fragment PstI-BamHI de 1278 pb. Ce fragment a été ligaturé avec le vecteur pVR1012 (exemple 7), préalablement digéré avec *PstI* et *BamHI*, pour donner le plasmide pAB094 (6136 pb) (Figure N° 14).

Exemple 20 : Construction du plasmide pAB093 (gène C du virus de l'encéphalite de l'Est)

20 Une réaction de RT-PCR selon la technique de l'exemple 6 a été réalisée avec l'ARN génomique du virus de l'encéphalite de l'Est (EEV) (Souche North America 82V2137) (S. Weaver *et al.* Virology. 1993. 197. 375-390), préparé selon la technique de l'exemple 4, et avec les oligonucléotides suivants:

AB174 (33 mer) (SEQ ID N° 25)

25 5'AAACTGCAGATGTTCCCATACCCTACACTTAAC 3'

AB175 (45 mer) (SEQ ID N° 26)

5'TGAAGATCTTCAATAAAAATCACCATGGCTCTGACCCCTCTGGTG 3'

pour isoler le gène codant pour la protéine de capsid C (EEV C) sous la forme d'un fragment PstI-BglII. Après purification, le produit de RT-PCR de 801 pb a été digéré par *PstI* et *BglII* pour isoler un fragment PstI-BglII de 785 pb. Ce fragment a été ligaturé avec le vecteur pVR1012 (exemple 7), préalablement digéré avec *PstI* et *BglII*, pour donner le plasmide pAB093 (5650 pb) (Figure N°

15).

Exemple 21 : Construction du plasmide pAB096 (gène E2 du virus de l'encéphalite de l'Ouest)

- 5 Une réaction de RT-PCR selon la technique de l'exemple 6 a été réalisée avec l'ARN génomique du virus de l'encéphalite de l'Ouest (WEV) (Souche BSF1703) (C. Hahn *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1988. 85. 5997-6001), préparé selon la technique de l'exemple 4, et avec les oligonucléotides suivants:

AB180 (35 mer) (SEQ ID N° 27)

- 10 5'ACGCGTCGACATGAGCATTACCGATGACTTCACAC 3'

AB181 (44 mer) (SEQ ID N° 28)

5'CGCGGATCCTCAATAAAAATCAAGCGTTGGTTGGCCGAATACAG 3'

pour isoler le gène codant pour la glycoprotéine E2 du WEV sous la forme d'un fragment Sall-BamHI. Après purification, le produit de RT-PCR de 1304 pb a été

- 15 digéré par *SaI* et *Bam*HI pour isoler un fragment Sall-BamHI de 1291 pb. Ce fragment a été ligaturé avec le vecteur pVR1012 (exemple 7), préalablement digéré avec *SaI* et *Bam*HI, pour donner le plasmide pAB096 (6159 pb) (Figure N° 16).

- 20 **Exemple 22 : Construction du plasmide pAB095 (gène C du virus de l'encéphalite de l'Ouest)**

Une réaction de RT-PCR selon l'exemple 6 a été réalisée avec l'ARN génomique du virus de l'encéphalite de l'Ouest (WEV) (Souche BSF1703) (C. Hahn *et al.* Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 1988. 85. 5997-6001), préparé selon l'exemple 4, et

- 25 avec les oligonucléotides suivants:

AB178 (34 mer) (SEQ ID N° 29)

5'ACGCGTCGACATGTTTCCATACCCTCAGCTGAAC 3'

AB179 (44 mer) (SEQ ID N° 30)

5'CGCGGATCCTCAATAAAAATCACCACGGTTCAGAACCTTCGGGG 3'

- 30 pour isoler le gène codant pour la protéine de capsid C du virus WEV sous la forme d'un fragment Sall-BamHI. Après purification, le produit de RT-PCR de 809 pb a été digéré par *SaI* et *Bam*HI pour isoler un fragment Sall-BamHI de

796 pb. Ce fragment a été ligaturé avec le vecteur pVR1012 (exemple 7), préalablement digéré avec *Sa*I et *Bam*HI, pour donner le plasmide pAB095 (5664 pb) (Figure N° 17).

5 Exemple 23 : Construction du plasmide pAB098 (gène E2 du virus de l'encéphalite vénézuélienne)

Une réaction de RT-PCR selon l'exemple 6 a été réalisée avec l'ARN génomique du virus de l'encéphalite vénézuélienne (VEV) (Souche P676 (Type IC)) (R. Kinney *et al.* Virology. 1992. 191. 569-580), préparé selon l'exemple 4, et

10 avec les oligonucléotides suivants:

AB184 (35 mer) (SEQ ID N° 31)

5'ACGCGTCGACATGTCCACCGAGGAGCTGTTTAAGG 3'

AB185 (44 mer) (SEQ ID N° 32)

5'CGCGGATCCTCAATAAAAATCAGGCCCGGGCAGTGCGGGCGCAG 3'

15 pour isoler le gène codant pour la glycoprotéine E2 du virus VEV sous la forme d'un fragment *Sa*I-*Bam*HI. Après purification, le produit de RT-PCR de 1304 pb a été digéré par *Sa*I et *Bam*HI pour isoler un fragment *Sa*I-*Bam*HI de 1291 pb. Ce fragment a été ligaturé avec le vecteur pVR1012 (exemple 7), préalablement digéré avec *Sa*I et *Bam*HI, pour donner le plasmide pAB098 (6159 pb) (Figure
20 N° 18).

Exemple 24 : Construction du plasmide pAB097 (gène C du virus de l'encéphalite vénézuélienne)

25 Une réaction de RT-PCR selon l'exemple 6 a été réalisée avec l'ARN génomique du virus de l'encéphalite vénézuélienne (VEV) (Souche P676 (Type IC)) (R. Kinney *et al.* Virology. 1992. 191. 569-580), préparé selon l'exemple 4, et avec les oligonucléotides suivants:

AB182 (30 mer) (SEQ ID N° 33)

5'AAACTGCAGATGTTCCCGTTCCAGCCAATG 3'

30 AB183 (45 mer) (SEQ ID N° 34)

5'CGCGGATCCTCAATAAAAATCACCATTGCTCGCAGTTCTCCGGAG 3'

pour isoler le gène codant pour la protéine de capsid C du virus VEV sous la

forme d'un fragment PstI-BamHI. Après purification, le produit de RT-PCR de 856 pb a été digéré par PstI et BamHI pour isoler un fragment PstI-BamHI de 839 pb. Ce fragment a été ligaturé avec le vecteur pVR1012 (exemple 7), préalablement digéré avec PstI et BamHI, pour donner le plasmide pAB097 (5698 pb) (Figure N° 19).

Exemple 25 : Construction du plasmide pAB041 (gène G du virus de la rage)

Une réaction RT-PCR selon l'exemple 6 a été réalisée avec l'ARN génomique du virus de la rage (Souche ERA) (A. Anilionis *et al.* Nature. 1981. 294. 275-278), préparé selon l'exemple 4, et avec les oligonucléotides suivants:

AB011 (33 mer) (SEQ ID N° 35)
5'AAACTGCAGAGATGGTTCCTCAGGCTCTCCTG 3'

AB012 (34 mer) (SEQ ID N° 36)
5'CGCGGATCCTCACAGTCTGGTCTCACCCCCACTC 3'

pour amplifier un fragment de 1589 pb contenant le gène codant pour la protéine G du virus de la rage. Après purification, le produit de RT-PCR a été digéré par PstI et BamHI pour donner un fragment PstI-BamHI de 1578 pb. Ce fragment a été ligaturé avec le vecteur pVR1012 (exemple 7), préalablement digéré avec PstI et BamHI, pour donner le plasmide pAB041 (6437 pb) (Figure N° 20).

Exemple 26 : Préparation et purification des plasmides

Pour la préparation des plasmides destinés à la vaccination des animaux, on peut utiliser toute technique permettant d'obtenir une suspension de plasmides purifiés majoritairement sous forme superenroulée. Ces techniques sont bien connues de l'homme de l'art. On peut citer en particulier la technique de lyse alcaline suivie de deux ultracentrifugations successives sur gradient de chlorure de césium en présence de bromure d'éthidium telle que décrite dans J. Sambrook *et al.* (*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor. New York. 1989). On peut se référer également aux demandes de brevet PCT WO 95/21250 et PCT WO 96/02658 qui décrivent des méthodes pour produire à l'échelle industrielle des

plasmides utilisables pour la vaccination. Pour les besoins de la fabrication des vaccins (voir exemple 17), les plasmides purifiés sont resuspendus de manière à obtenir des solutions à haute concentration (> 2 mg/ml) compatibles avec le stockage. Pour ce faire, les plasmides sont resuspendus soit en eau ultrapure, 5 soit en tampon TE (Tris-HCl 10 mM; EDTA 1 mM, pH 8,0).

Exemple 27 : Fabrication des vaccins associés

Les divers plasmides nécessaires à la fabrication d'un vaccin associé sont mélangés à partir de leurs solutions concentrées (exemple 16). Les mélanges 10 sont réalisés de telle manière que la concentration finale de chaque plasmide corresponde à la dose efficace de chaque plasmide. Les solutions utilisables pour ajuster la concentration finale du vaccin peuvent être soit une solution NaCl à 0,9 % , soit du tampon PBS.

Des formulations particulières telles que les liposomes, les lipides cationiques, 15 peuvent aussi être mises en œuvre pour la fabrication des vaccins.

Exemple 28 : Vaccination des chevaux

Les chevaux sont vaccinés avec des doses de 100 μ g, 250 μ g ou 500 μ g par plasmide.

20 Les injections peuvent être réalisées à l'aiguille par voie intramusculaire dans les muscles du cou. Dans ce cas, les doses vaccinales sont administrées sous un volume de 2 ml.

Les injections peuvent être réalisées par voie intradermique en utilisant un appareil d'injection à jet liquide (sans aiguille) délivrant une dose de 0,2 ml en 25 5 points (0,04 ml par point d'injection) (par exemple, appareil "PIGJET"). Dans ce cas, les doses vaccinales sont administrées sous des volumes de 0,2 ou 0,4 ml, ce qui correspond respectivement à une ou à deux administrations. Lorsque deux administrations successives sont pratiquées au moyen de l'appareil PIGJET, ces administrations sont réalisées de manière décalée, de façon à ce 30 que les deux zones d'injection soient séparées l'une de l'autre par une distance d'environ 1 à 2 centimètres.

REVENDICATIONS

1. Formule de vaccin contre des pathologies des équidés et notamment des chevaux, comprenant au moins 3 valences de vaccin polynucléotidique comprenant chacune un plasmide intégrant, de manière à l'exprimer in vivo dans les cellules hôtes, un gène d'une valence de pathogène équin, ces valences étant choisies parmi celles du groupe consistant en virus de la rhinopneumonie équine EHV, virus de la grippe équine EIV et le tétanos, ces plasmides comprenant, pour chaque valence, un ou plusieurs des gènes choisis parmi le groupe consistant en gB et gD pour le virus de la rhinopneumonie équine, HA, NP, N pour le virus de la grippe équine et un gène codant pour tout ou partie de la sous-unité C de la toxine tétanique.

2. Formule de vaccin selon la revendication 1, caractérisée en ce que le vaccin comprend dans la valence rhinopneumonie équine, au moins un antigène de la souche EHV-1 et au moins un antigène de la souche EHV-4, de préférence le même type d'antigène.

3. Formule de vaccin selon la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce qu'elle comprend les gènes gB et gD du virus de la rhinopneumoniae équine.

4. Formule selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle comprend le gène codant pour l'hémagglutinine HA ou l'association des gènes codant pour HA et NP du virus de la grippe équine.

5. Formule de vaccin selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisée en ce qu'elle comporte une ou plusieurs autres valences d'autres pathogènes des équins, choisis parmi le groupe consistant en virus de l'encéphalite de l'Est EEV, de l'encéphalite de l'Ouest WEV et de l'encéphalite vénézuélienne VEV, de préférence les trois simultanément, valence de la maladie de Lyme, virus de l'artérite équine et virus de la rage, les plasmides comprenant, pour chaque valence, un ou plusieurs des gènes choisis parmi les gènes des antigènes C et E2 des encéphalites, OspA, OspB et p100 de la maladie de Lyme, E, M et N de l'artérite équine et le gène G pour la rage.

6. Formule de vaccin selon la revendication 5, caractérisée en ce qu'elle comprend le gène E2 ou les gènes C et E2 de l'encéphalite.

5 7. Formule de vaccin selon la revendication 5, caractérisée en ce qu'elle comprend le gène OspA du virus de la maladie de Lyme.

10 8. Formule de vaccin selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisée en ce qu'elle comprend de 10 ng à 1 mg, de préférence de 100 ng à 500 µg, plus préférentiellement encore de 1 µg à 250 µg de chaque plasmide.

15 9. Utilisation d'un ou plusieurs plasmides tels que décrits dans l'une quelconque des revendications 1 à 9, pour la fabrication d'un vaccin destiné à vacciner les équidés primo-vaccinés au moyen d'un premier vaccin choisi dans le groupe consistant en vaccin entier vivant, vaccin entier inactivé, vaccin de sous-unité, vaccin recombinant, ce premier vaccin présentant le ou les antigène(s) codé(s) par le ou les plasmide(s) ou antigène(s) assurant une protection croisée.

20 10. Kit de vaccination des équidés regroupant une formule de vaccin selon l'une quelconque des revendications 1 à 8 et un vaccin choisi dans le groupe consistant en vaccin entier vivant, vaccin entier inactivé, vaccin de sous-unité, vaccin recombinant, ce premier vaccin présentant l'antigène codé par le vaccin polynucléotidique ou un antigène assurant une protection croisée, pour une administration de ce dernier en primo-vaccination et pour un rappel avec la formule de vaccin.

25 11. Formule de vaccin selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, accompagnée d'une notice indiquant que cette formule est utilisable en rappel d'un premier vaccin équidé choisi dans le groupe consistant en vaccin entier vivant, vaccin entier inactivé, vaccin de sous-unité, vaccin recombinant, ce premier vaccin présentant l'antigène codé par le vaccin polynucléotidique ou un antigène assurant une protection croisée.

1/21

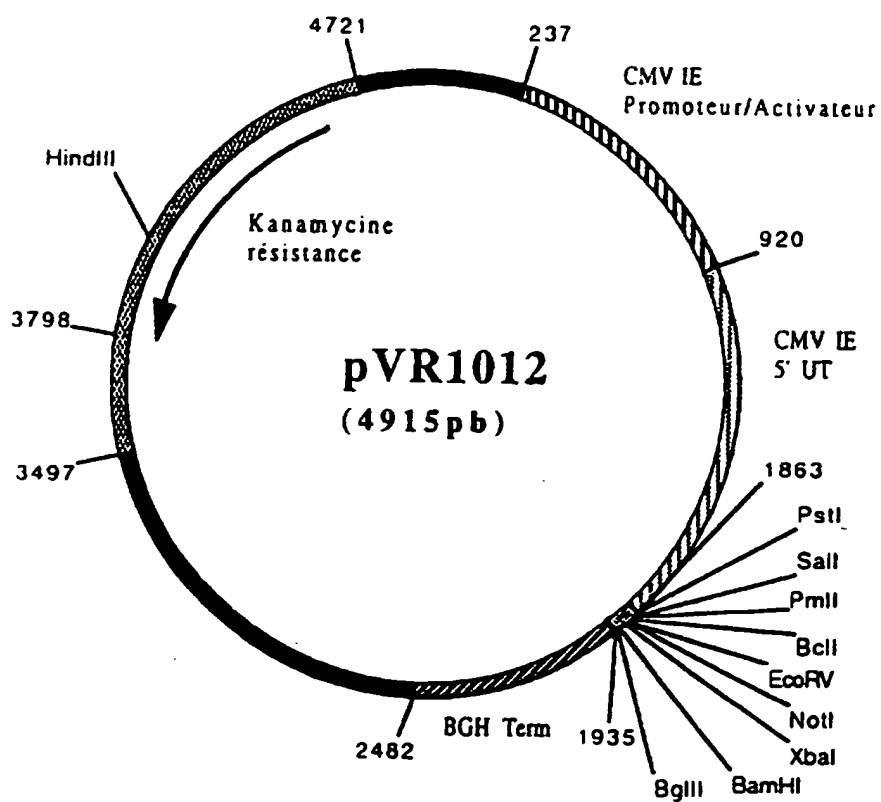


Figure N° 1

2/21

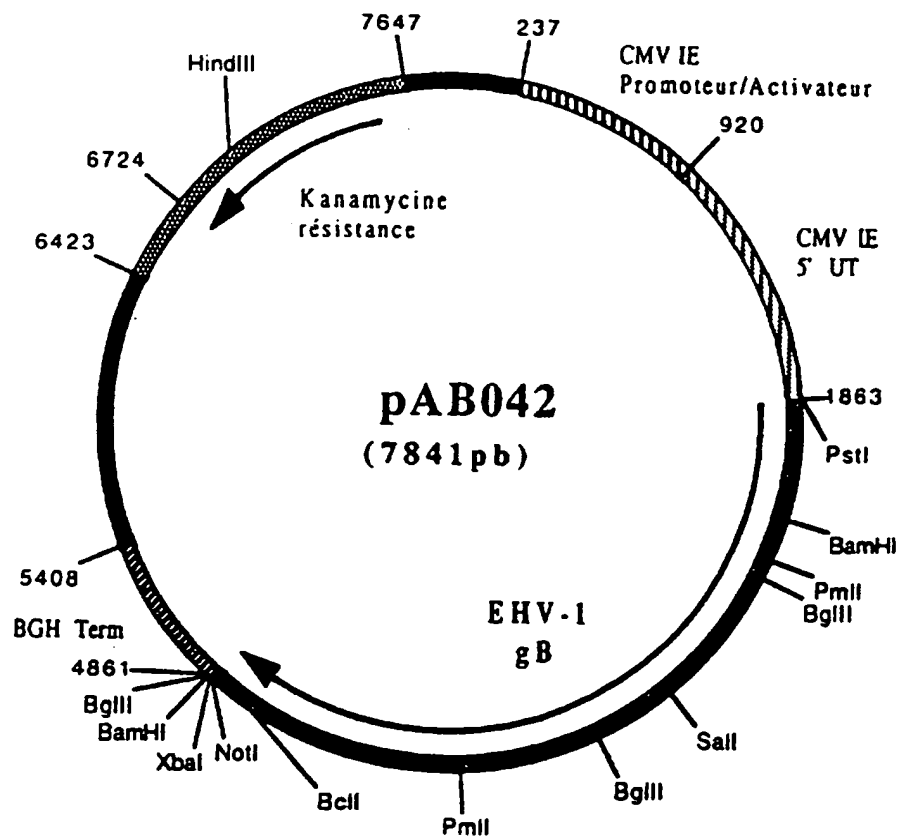


Figure N° 2

4/21

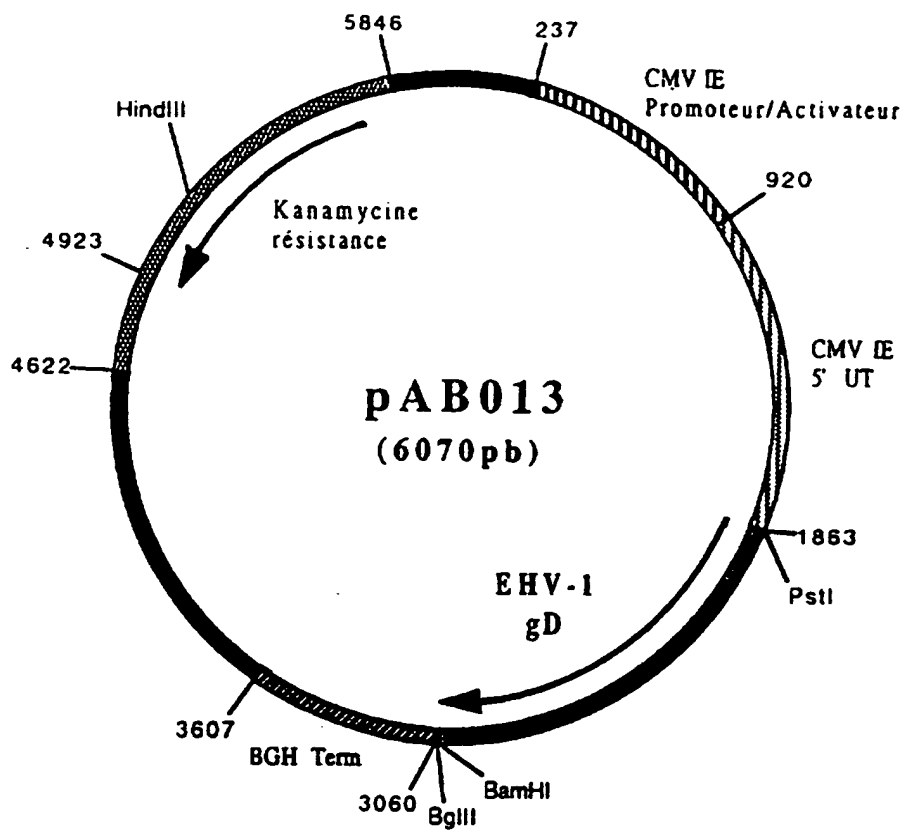


Figure N° 4

5/21

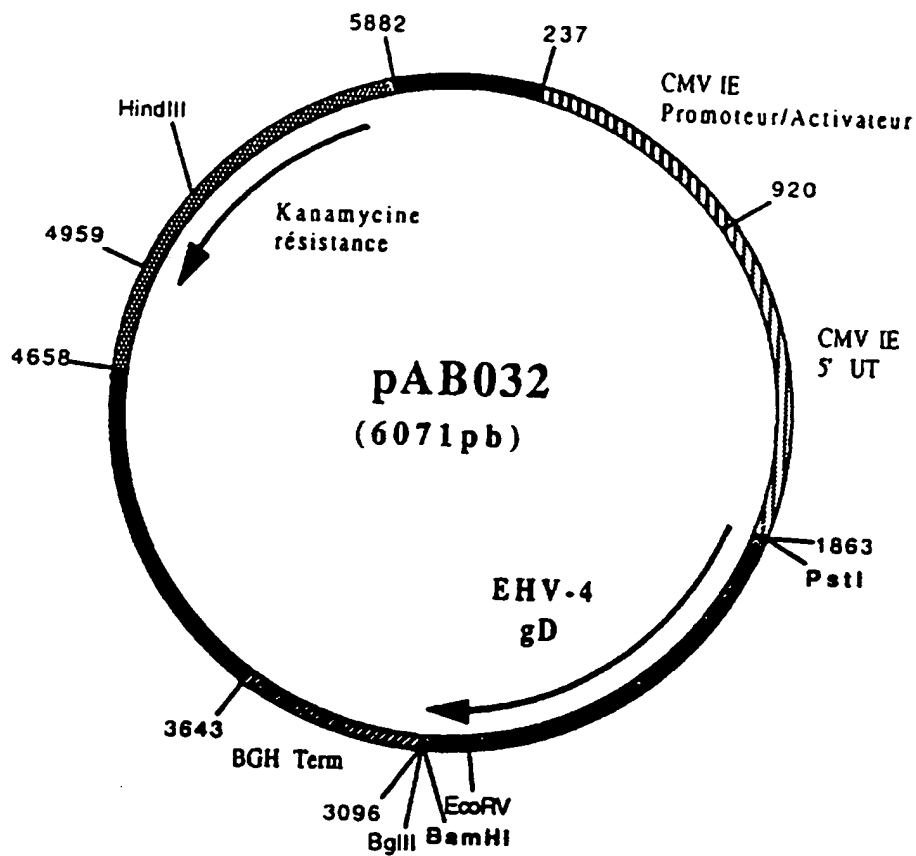


Figure N° 5

6/21

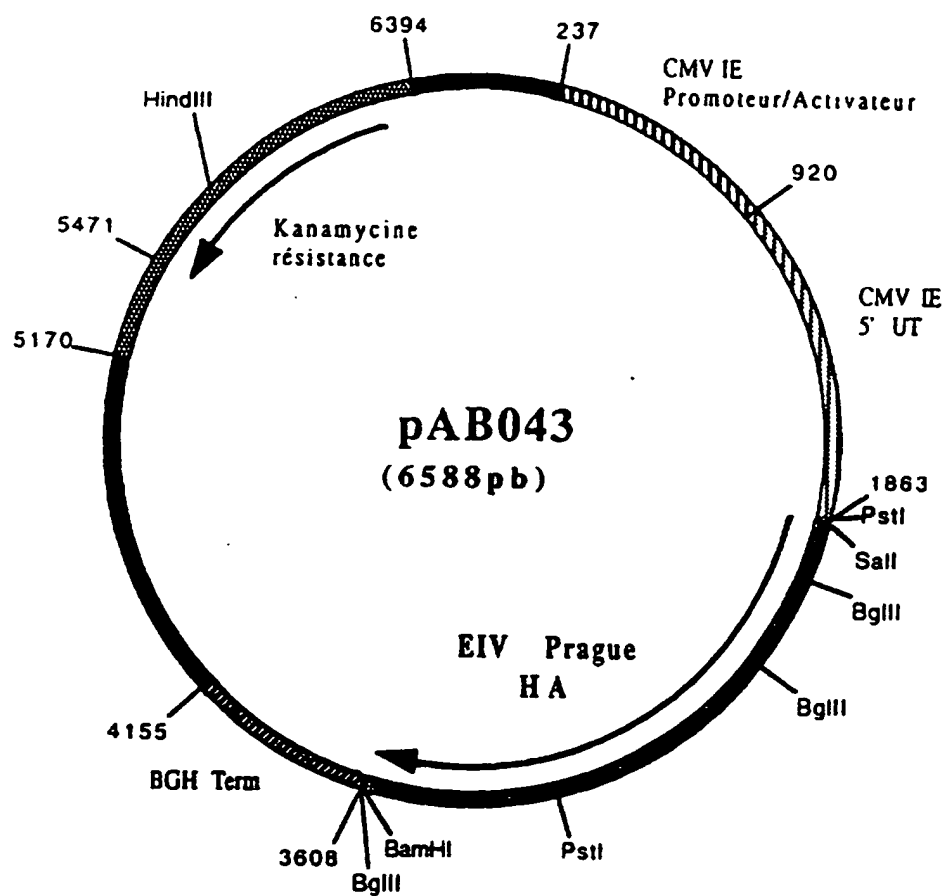


Figure N° 6

7/21

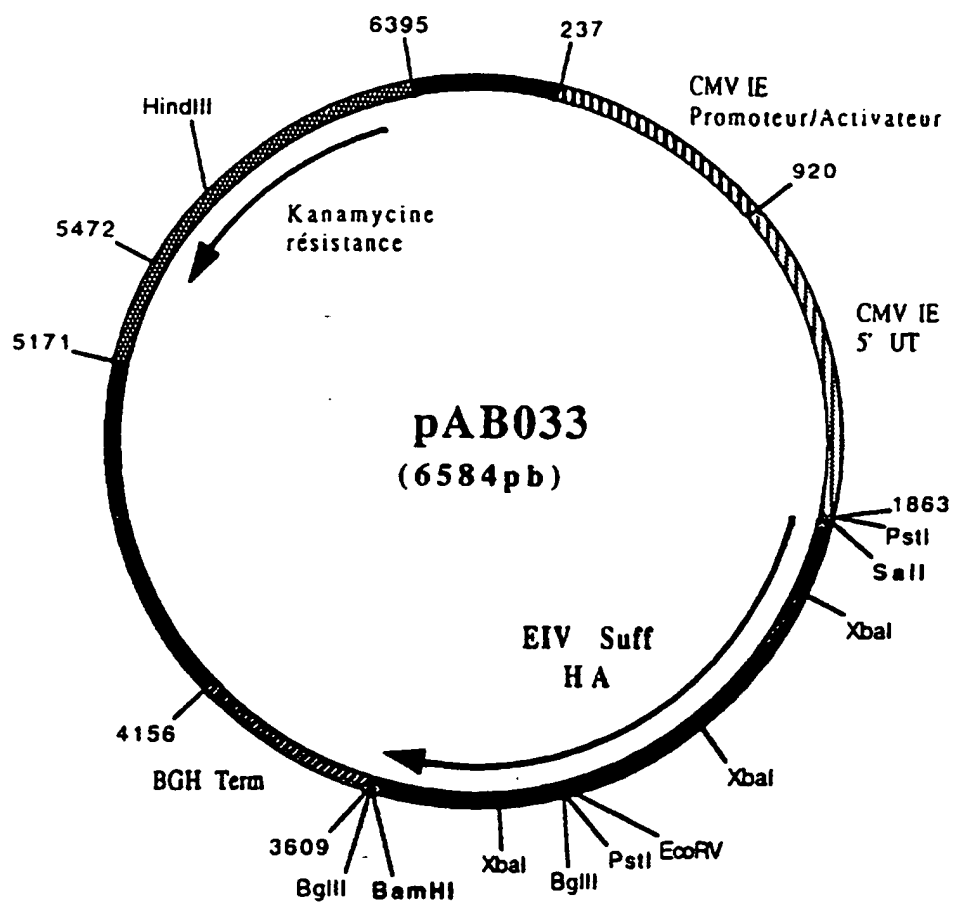


Figure N° 7

8/21

1 ATGAAGACAACCATTATTTTGGATACTACTGACCCATTGGGTCTACAGTCAAAACCCAACCAGT
1 Met Lys Thr Thr Ile Ile Leu Ile Leu Leu Thr His Trp Val Tyr Ser Gln Asn Pro Thr Ser
54 GGCAACAACACAGCCACACTATGTCTGGGACACCATGCAGTAGCAAATGGAACATTGGTAAAA
22 Gly Asn Asn Thr Ala Thr Leu Cys Leu Gly His His Ala Val Ala Asn Gly Thr Leu Val Lys
127 ACAATAACTGACGACCAAATGAGGTGACAAATGCTACTGAATTAGTTCAGAGCACTTCAATA
43 Thr Ile Thr Asp Asp Gln Ile Glu Val Thr Asn Ala Thr Glu Leu Val Gln Ser Thr Ser Ile
190 GGGAAAATATGCAACAACCCATATAGGGTTCTAGATGGAAGAACTGCACATTAATAGATGCA
64 Gly Lys Ile Cys Asn Asn Pro Tyr Arg Val Leu Asp Gly Arg Asn Cys Thr Leu Ile Asp Ala
253 ATGCTAGGAGATCCCCACTGTGATGTTTTTTCAGTATGAGAATTGGGACCTCTTCATAGAAAGA
85 Met Leu Gly Asp Pro His Cys Asp Val Phe Gln Tyr Glu Asn Trp Asp Leu Phe Ile Glu Arg
316 AGCAGCGCTTTCAGCAATTGCTACCCATATGACATCCCTGACTATGCATCGCTCCGGTCTATT
106 Ser Ser Ala Phe Ser Asn Cys Tyr Pro Tyr Asp Ile Pro Asp Tyr Ala Ser Leu Arg Ser Ile
379 GTGGCATCTTCAGGAACATTAGAATTCACAGCAGAGGGATTACATGGACAGGTGTCACTCAA
127 Val Ala Ser Ser Gly Thr Leu Glu Phe Thr Ala Glu Gly Phe Thr Trp Thr Gly Val Thr Gln
442 AACGGAAGAAGTGGCGCCTGCAGAAGGGGATCAGCCGATAGTTTCTTTAGCCGACTGAATTGG
148 Asn Gly Arg Ser Gly Ala Cys Arg Arg Gly Ser Ala Asp Ser Phe Phe Ser Arg Leu Asn Trp
505 CTAACAGAATCTGGAAATCTTACCCACATTGAATGTAACAATGCCTAACAATAACAATTTCT
169 Leu Thr Glu Ser Gly Asn Ser Tyr Pro Thr Leu Asn Val Thr Met Pro Asn Asn Asn Asn Phe
568 GATAAACTATACATCTGGGGGATCCATCACCCGAGCACAAACAATGAGCAGACAAAATTGTAT
190 Asp Lys Leu Tyr Ile Trp Gly Ile His His Pro Ser Thr Asn Asn Glu Gln Thr Lys Leu Tyr
631 GTCCAAGAATTAGGGCGAGTAACAGTCTCAACAAAAAGAAGTCAACAAACAATAATCCCCAAC
211 Val Gln Glu Leu Gly Arg Val Thr Val Ser Thr Lys Arg Ser Gln Gln Thr Ile Ile Pro Asn
694 ATCGGATCTAGACCGGGGGTCAAGGGTCAATCAGGCAGGATAAGCATATATTGGACCATTGTG
232 Ile Gly Ser Arg Pro Gly Val Arg Gly Gln Ser Gly Arg Ile Ser Ile Tyr Trp Thr Ile Val
757 AAACCTGGAGATATCCTAATGATAAACAGTAATGGCAACTTAGTTGCACCGCGGGGATATTTCT
253 Lys Pro Gly Asp Ile Leu Met Ile Asn Ser Asn Gly Asn Leu Val Ala Pro Arg Gly Tyr Phe
820 AAAATGCGAACAGGAAAAAGCTCTATAATGAGATCAGATGCACCCATAGACACTTGTGTGTCC
274 Lys Met Arg Thr Gly Lys Ser Ser Ile Met Arg Ser Asp Ala Pro Ile Asp Thr Cys Val Ser
883 GAGTGTATTACACCAAATGGAAGCATCCCCAACGACAAACCATTTCAAATGTGAACAAAGTT
295 Glu Cys Ile Thr Pro Asn Gly Ser Ile Pro Asn Asp Lys Pro Phe Gln Asn Val Asn Lys Val
946 ACATATGGAAAATGCCCCAAGTATATCAAGCAGAATACTTTGAAGCTGGCCACTGGGATGAGG
316 Thr Tyr Gly Lys Cys Pro Lys Tyr Ile Lys Gln Asn Thr Leu Lys Leu Ala Thr Gly Met Arg
1009 AATGTACCAGAAAAGCAAATCAGAGGAATCTTTGGAGCAATAGCGGGATTTCATAGAAAATGGC
337 Asn Val Pro Glu Lys Gln Ile Arg Gly Ile Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe Ile Glu Asn Gly
1072 TGGGAGGGAATGGTTGATGGGTGGTATGGATTCCGATATCAGAATTCGGAAGGAACAGGACAA
358 Trp Glu Gly Met Val Asp Gly Trp Tyr Gly Phe Arg Tyr Gln Asn Ser Glu Gly Thr Gly Gln
1135 GCTGCAGATCTAAAGAGCACTCAAGCAGCCATCGACCAGATCAATGGAAAATTGAACAGAGTG
379 Ala Ala Asp Leu Lys Ser Thr Gln Ala Ala Ile Asp Gln Ile Asn Gly Lys Leu Asn Arg Val

Figure N° 8

9/21

1198 ATTGAGAGGACCAATGAGAAATTCCATCAAATAGAGAAGGAATTCTCAGAAGTAGAAGGGAGA
400▶ IleGluArgThrAsnGluLysPheHisGlnIleGluLysGluPheSerGluValGluGlyArg

1261 ATCCAGGACTTGGAGAAGTATGTAGAAGACACCAAAATAGACCTATGGTCCTACAATGCAGAG
421▶ IleGlnAspLeuGluLysTyrValGluAspThrLysIleAspLeuTrpSerTyrAsnAlaGlu

1324 TTA CTGGTGGCTCTAGAAAATCAACATACGATTGACTTAACAGATGCAGAGATGAATAAATTA
442▶ LeuLeuValAlaLeuGluAsnGlnHisThrIleAspLeuThrAspAlaGluMetAsnLysLeu

1387 TTCGAGAAGACTAGGCGCCAGTTAAGAGAAAACGCGGAAGACATGGGGGGTGGATGTTTCAAG
463▶ PheGluLysThrArgArgGlnLeuArgGluAsnAlaGluAspMetGlyGlyGlyCysPheLys

1450 ATTTATCACAAATGTGATAATGCATGCATTGGATCAATAAGAAATGGGACATATGACCATTAC
484▶ IleTyrHisLysCysAspAsnAlaCysIleGlySerIleArgAsnGlyThrTyrAspHisTyr

1513 ATATACAGAGATGAAGCATTAACAACCGATTTCAAATTAAAGGTGTTGAGTTGAAATCAGGC
505▶ IleTyrArgAspGluAlaLeuAsnAsnArgPheGlnIleLysGlyValGluLeuLysSerGly

1576 TACAAAGATTGGATACTGTGGATTTTCATTCGCCATATCATGCTTCTTAATTTGCGTTGTTCTA
526▶ TyrLysAspTrpIleLeuTrpIleSerPheAlaIleSerCysPheLeuIleCysValValLeu

1639 TTGGGTTTCATTATGTGGGCTTGCCAAAAAGGCAACATCAGATGCAACATTTGCATTTGA
547▶ LeuGlyPheIleMetTrpAlaCysGlnLysGlyAsnIleArgCysAsnIleCysIle...

Figure N° 8 (suite et fin)

11/21

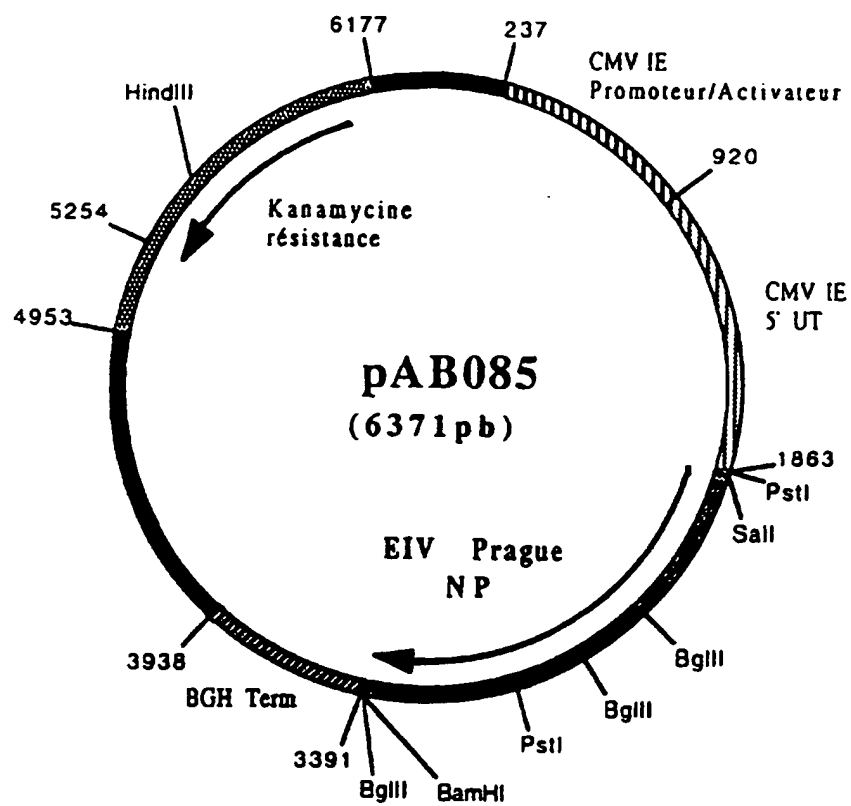


Figure N° 10

12/21

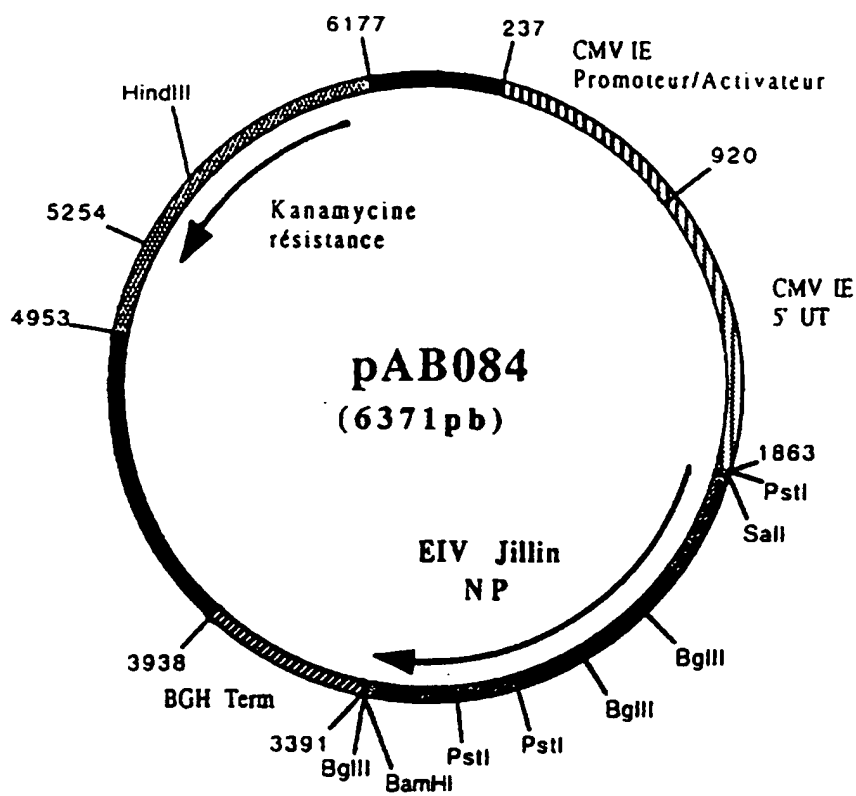


Figure N° 11

13/21

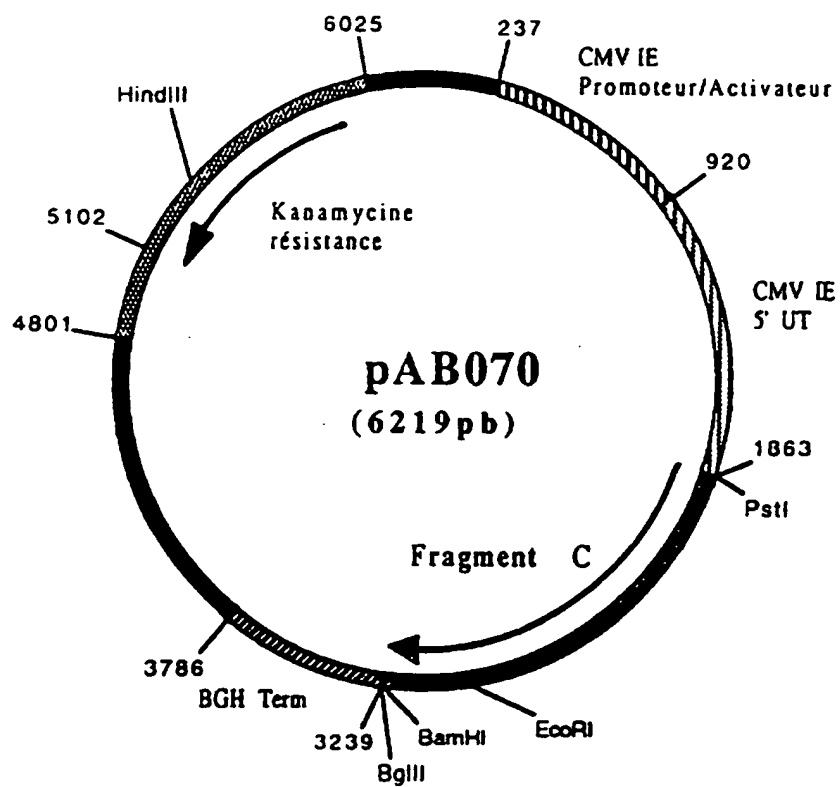


Figure N° 12

14/21

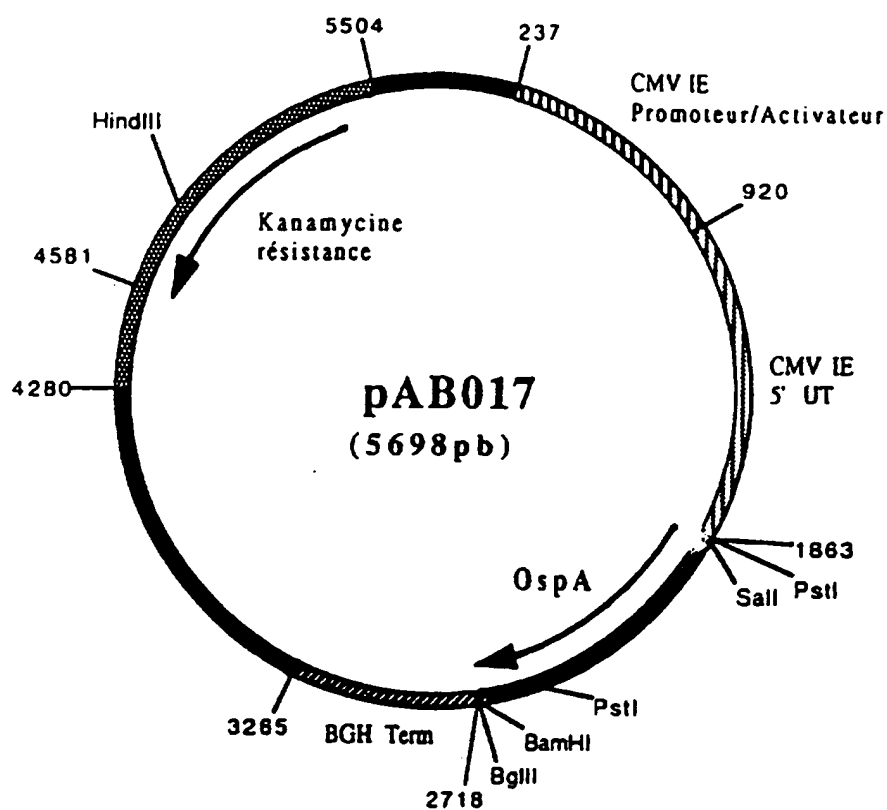


Figure N° 13

15/21

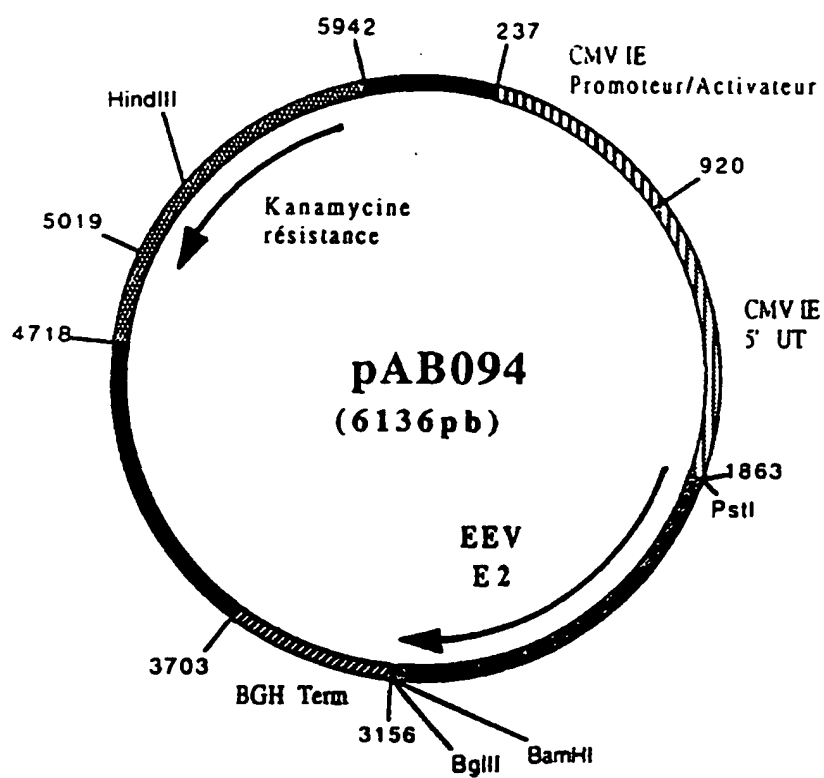


Figure N° 14

16/21

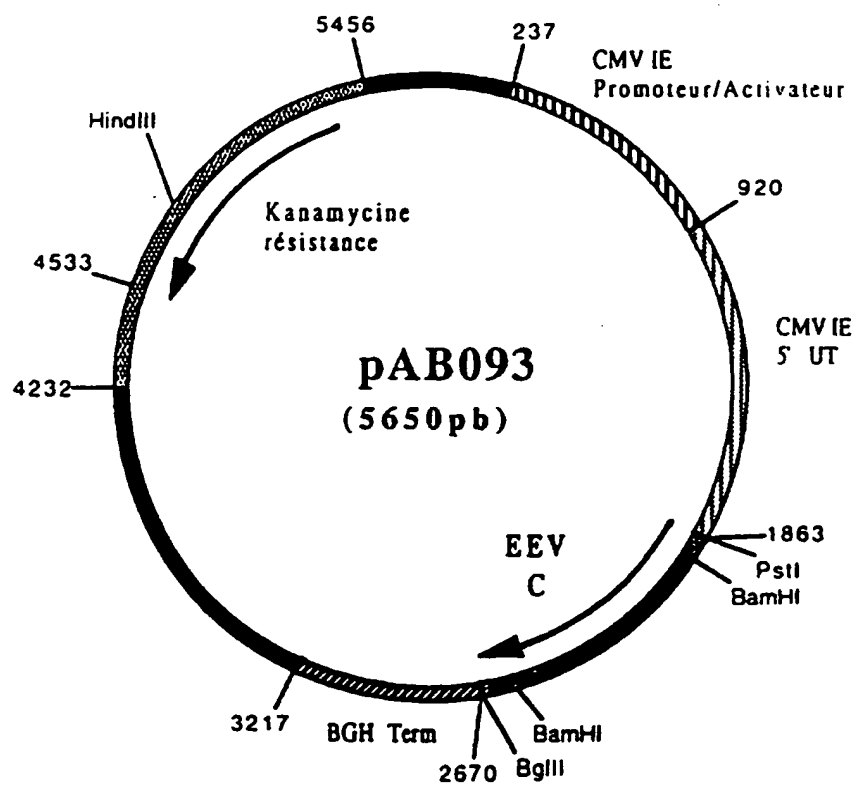


Figure N° 15

17/21

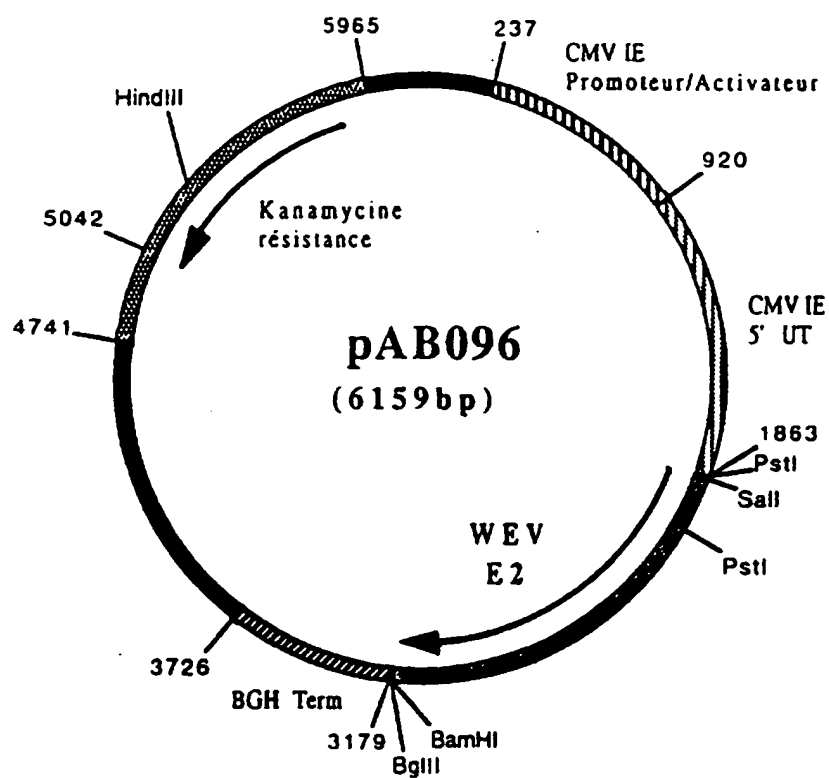


Figure N° 16

18/21

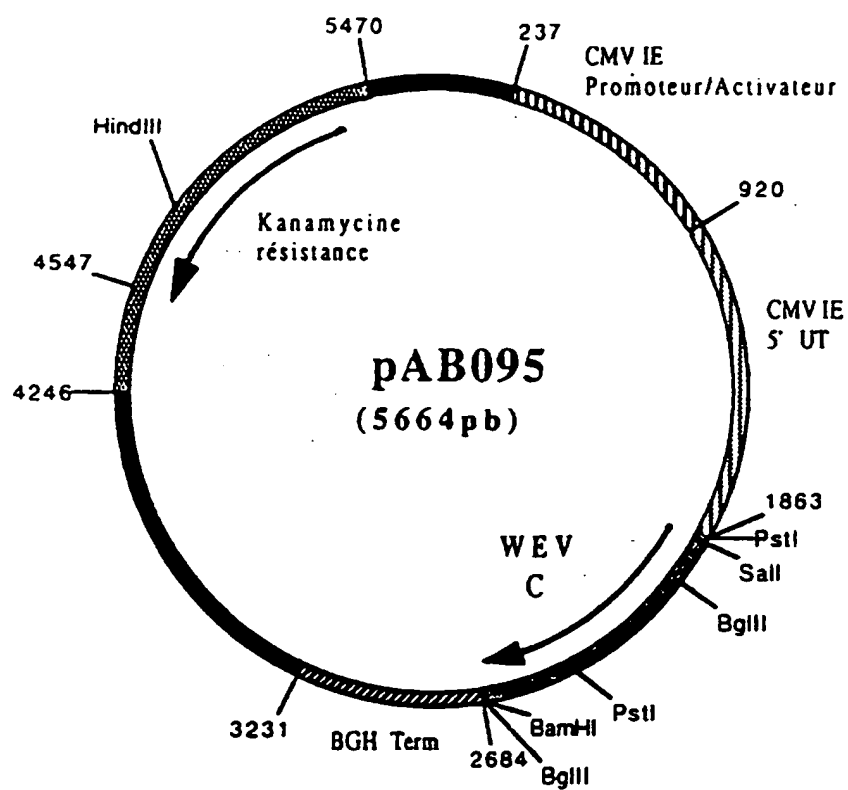


Figure N° 17

19/21

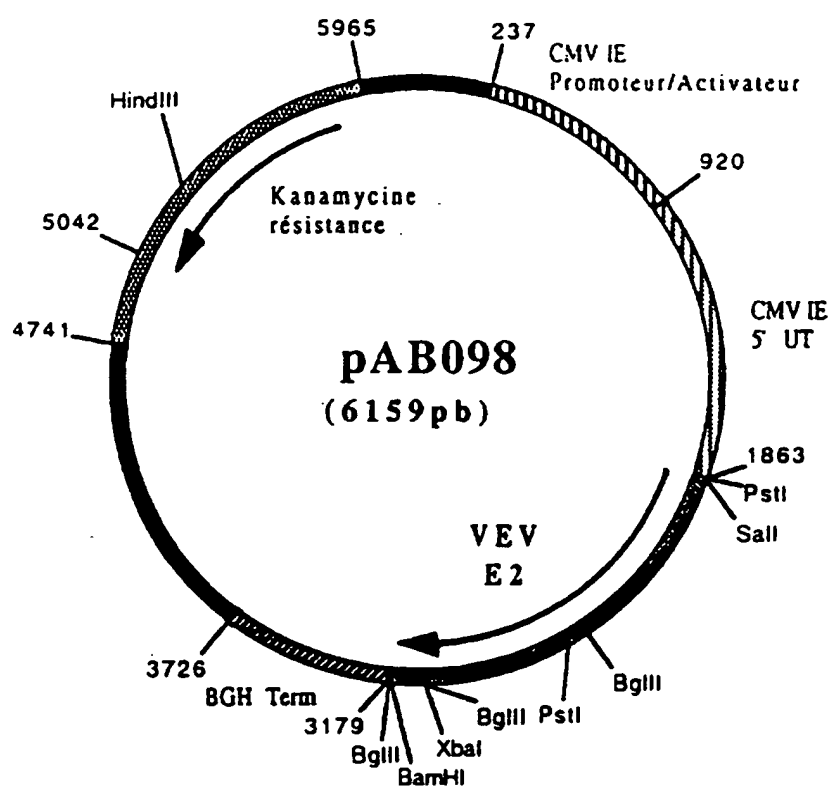


Figure N° 18

20/21

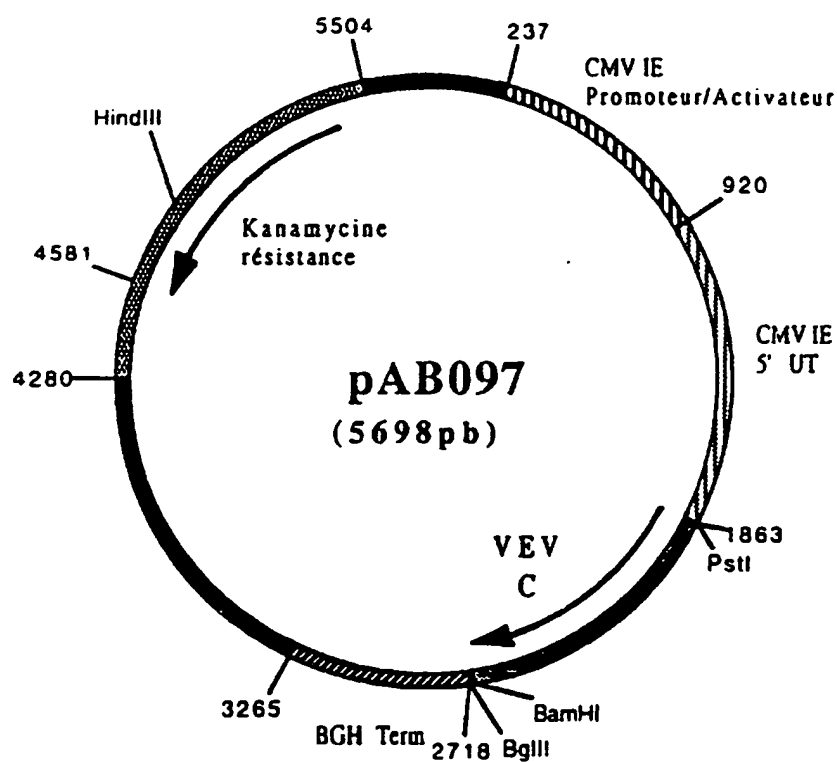


Figure N° 19

21/21

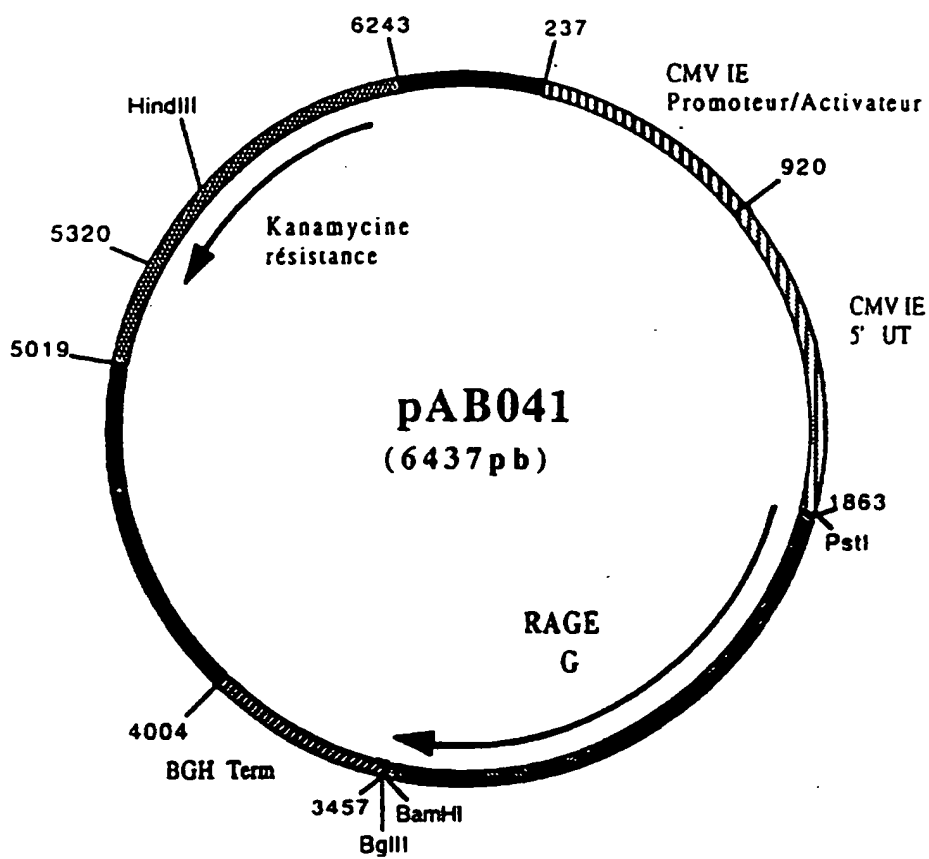


Figure N° 20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 97/01314

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 A61K39/295 //C12N15/38, C12N15/44, C12N15/31

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 A61K C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 95 20660 A (UNIVERSITY OF MASSACHUSETTS MEDICAL CENTER) 3 August 1995 cited in the application see the whole document ---	1-11
A	EP 0 304 786 A (MOBAY CORPORATION) 1 March 1989 see the whole document ---	1-11
A	ULMER J B ET AL: "HETEROLOGOUS PROTECTION AGAINST INFLUENZA BY INJECTION OF DNA ENCODING A VIRAL PROTEIN" SCIENCE, vol. 259, 19 March 1993, pages 1745-1749, XP002009751 ---	1-11
-/--		

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

21 November 1997

Date of mailing of the international search report

28/11/1997

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Moreau, J

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 97/01314

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0 447 303 A (RHONE MERIEUX) 18 September 1991 see the whole document -----	1-11
A	WO 93 19183 A (UNIVERSITY OF MASSACHUSETTS MEDICAL CENTER) 30 September 1993 see the whole document -----	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 97/01314

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9520660 A	03-08-95	CA 2181832 A	03-08-95
		EP 0740704 A	06-11-96
		US 5620896 A	15-04-97
<hr/>			
EP 304786 A	01-03-89	US 4944942 A	31-07-90
		AU 615470 B	03-10-91
		AU 2152988 A	02-03-89
		CA 1337331 A	17-10-95
		JP 1071819 A	16-03-89
<hr/>			
EP 447303 A	18-09-91	FR 2659349 A	13-09-91
		AT 142265 T	15-09-96
		AU 641493 B	23-09-93
		AU 7542091 A	10-10-91
		CA 2055489 A	13-09-91
		DE 69121746 D	10-10-96
		DE 69121746 T	20-03-97
		ES 2094207 T	16-01-97
		WO 9113995 A	19-09-91
		JP 5501206 T	11-03-93
		US 5266489 A	30-11-93
<hr/>			
WO 9319183 A	30-09-93	US 5643578 A	01-07-97
		CA 2132836 A	30-09-93
		EP 0633937 A	18-01-95
		JP 7507203 T	10-08-95
		US 5620896 A	15-04-97

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Der e Internationale No
PCT/FR 97/01314

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 6 A61K39/295 //C12N15/38,C12N15/44,C12N15/31

Seton la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 A61K C07K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	WO 95 20660 A (UNIVERSITY OF MASSACHUSETTS MEDICAL CENTER) 3 août 1995 cité dans la demande voir le document en entier ---	1-11
A	EP 0 304 786 A (MOBAY CORPORATION) 1 mars 1989 voir le document en entier ---	1-11
A	ULMER J B ET AL: "HETEROLOGOUS PROTECTION AGAINST INFLUENZA BY INJECTION OF DNA ENCODING A VIRAL PROTEIN" SCIENCE, vol. 259, 19 mars 1993, pages 1745-1749, XP002009751 ---	1-11
-/--		

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

Catégories spéciales de documents cités.

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (celle qui indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- "Z" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

21 novembre 1997

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

28/11/1997

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé
Moreau, J

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Der. Internationale No
PCT/FR 97/01314

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	EP 0 447 303 A (RHONE MERIEUX) 18 septembre 1991 voir le document en entier ----	1-11
A	WO 93 19183 A (UNIVERSITY OF MASSACHUSETTS MEDICAL CENTER) 30 septembre 1993 voir le document en entier -----	1-10

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Don : Internationale No

PCT/FR 97/01314

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9520660 A	03-08-95	CA 2181832 A	03-08-95
		EP 0740704 A	06-11-96
		US 5620896 A	15-04-97
EP 304786 A	01-03-89	US 4944942 A	31-07-90
		AU 615470 B	03-10-91
		AU 2152988 A	02-03-89
		CA 1337331 A	17-10-95
		JP 1071819 A	16-03-89
EP 447303 A	18-09-91	FR 2659349 A	13-09-91
		AT 142265 T	15-09-96
		AU 641493 B	23-09-93
		AU 7542091 A	10-10-91
		CA 2055489 A	13-09-91
		DE 69121746 D	10-10-96
		DE 69121746 T	20-03-97
		ES 2094207 T	16-01-97
		WO 9113995 A	19-09-91
		JP 5501206 T	11-03-93
		US 5266489 A	30-11-93
WO 9319183 A	30-09-93	US 5643578 A	01-07-97
		CA 2132836 A	30-09-93
		EP 0633937 A	18-01-95
		JP 7507203 T	10-08-95
		US 5620896 A	15-04-97